

# Inaugural - Dissertation

Zur  
Erlangung der Doktorwürde  
Der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
Der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

Vorgelegt von

Dipl.-Phys. Thomas Ehmer  
Aus Freudenstadt

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 2000

Thema:

**Der Einfluss lokaler  
Ionenkonzentrationsänderungen in Membrannähe  
bei *Voltage-Clamp* Messungen  
am Modellsystem Skelettmuskel**

Gutachter: Prof. Dr. Rainer H.A. Fink  
Prof. Dr. Michael Wink

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.	Historischer Kontext	5
2.	Allgemeine Fragestellung	6
3.	Spezielle Fragestellung	6
4.	Ziel der Arbeit	7
<b>II.</b>	<b>GRUNDLAGEN</b>	<b>9</b>
<b>A.</b>	<b>Biophysik</b>	<b>10</b>
1.	Die Anfänge	10
2.	Diffusion in wässriger Lösung	10
3.	Diffusion und Mobilität	13
4.	Elektrodiffusion: Die Nernst-Planck-Gleichung	14
5.	Ionenverteilung und Gleichgewichtspotential, Herleitung der Nernst-Gleichung	15
6.	Fasermodell, elektrophysiologische Eigenschaften	16
7.	Lineare Kabeltheorie	17
8.	Das kurze Kabel	19
9.	Punktförmige Stromquelle	20
10.	<i>Voltage-Clamp</i> – Prinzip	22
11.	Die 2 Mikroelektroden <i>Voltage-Clamp</i> Methode(2-MVC)	23
12.	Stromdichtemessungen mit der 3-MVC	25
13.	Kontrolle der intrazellulären Lösung, die <i>Vaseline-Gap</i> Methode	26
<b>B.</b>	<b>Physiologie des Skelettmuskels</b>	<b>28</b>
1.	Aufbau des Skelettmuskels	29
2.	Struktur des transversen tubulären Systems (TTS)	31
3.	Funktion des TTS	35
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>37</b>
<b>A.</b>	<b>Elektrophysiologie</b>	<b>38</b>
1.	Präparation der Einzelfasern	38
2.	Lösungen	40
3.	2 Mikroelektroden <i>Voltage-Clamp</i> (2-MVC) Strommessungen	41
<b>B.</b>	<b>Mathematische Modellierung</b>	<b>46</b>
1.	Die Muskelzelle als Kabel	49
2.	Das TTS als Kabelnetzwerk	49
3.	Das TTS als Scheibe	53
4.	Erste Erweiterung: Experimentelle Daten als Input am Beispiel der $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme	57
5.	Zeitabhängigkeit (Kanalkinetik) der Leitfähigkeit	58
6.	Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit	59
7.	Verteilung der Leitfähigkeit in der TTS-Membran und in der „scheinbaren“-Oberflächenmembran (ASM)	60
8.	Modellierung einer inhomogenen $\text{K}_{\text{ATP}}$ Kanaldichte-Verteilung	60
9.	Zweite Erweiterung: Änderung der intrazellulären Konzentration	61
<b>C.</b>	<b>Numerische Simulation</b>	<b>68</b>
1.	Algorithmus, Diskretisierung in Ort und Zeit	69
2.	Adaptive Fehlergrenzen	72
3.	Intrazelluläre Konzentrationsänderungen	73
4.	Konvergenz-Test des Algorithmus: Diffusionsgleichung und deren Lösung	74

<b>D.</b>	<b>Datenerfassung</b>	<b>78</b>
1.	Hardware und Softwaretools	78
2.	Umwandlung analoger Papierplots in digitale Computerfiles	78
3.	Dateiformate	80
<b>E.</b>	<b>Verfahren zur Optimierung der Simulations-Parameter</b>	<b>83</b>
<b>F.</b>	<b>Messung der extrazellulären <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Konzentration mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie</b>	<b>86</b>
1.	Konfokales Setup	86
2.	Farbstoff X-Rhod 5N	87
3.	Fluoreszenzfarbstoff-Lösung	87
4.	Bildaufnahme	88
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>89</b>
<b>A.</b>	<b>Test des Algorithmus</b>	<b>92</b>
<b>B.</b>	<b><math>\text{Ca}^{2+}</math>-Ströme -- Idealisierte Stromantworten</b>	<b>94</b>
1.	Faserparameter	95
2.	Konstante Spannung statt Aktionspotentiale?	95
3.	Anteil $f_T$ der TTS Leitfähigkeit an der Gesamtleitfähigkeit	96
4.	Bruchteil $\rho$ des TTS Volumens bezogen auf das Gesamtvolumen der Faser	97
5.	Faserradius $a$	99
6.	Eingangswiderstand $r_s$	102
7.	Extrazelluläre Ionenkonzentration	103
8.	Kommando-Potential $V_{\text{clamp}}$	108
9.	Spannungsbhängige Leitfähigkeit	109
<b>C.</b>	<b><math>\text{Ca}^{2+}</math>-Ströme -- Experimentelle Meßwerte als Simulations-Input</b>	<b>111</b>
1.	Vergleich der Simulations-Ausgabe mit experimentellen Meßwerten	112
2.	Berechnete Konzentrationsänderungen	118
3.	Zeitliche Entwicklung der Pufferwirkung	119
4.	Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung	120
5.	Zweiter "Anstieg" der Strom-Amplitude in einigen Fasern	123
6.	Eine mögliche Erklärung des "vermeintlichen" Wiederanstiges	124
7.	Messungen in einer "High-Kalium" Lösung	125
<b>D.</b>	<b>Messung der extrazellulären <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Konzentration</b>	<b>127</b>
<b>E.</b>	<b><math>\text{K}^+</math>-Ströme</b>	<b>132</b>
1.	Messungen mit der 3-MVC	132
2.	Membranstromdichte und Simulation: erste Näherung	133
3.	Veränderung von $\rho$ bei großen Stromdichten	134
4.	Zweite Näherung: Variation von $\vartheta$ zur Untersuchung der Verteilung der $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanaldichte	136
5.	Dritte Näherung: Konstantes $\rho$ und zusätzliche Konzentrationsänderung in der Nähe der „scheinbaren“ Oberflächenmembran (ASM)	138
6.	Weitere Stromkomponenten	139
7.	Getrennte Untersuchung der <i>Tail-currents</i> bei unterschiedlicher Depolarisationsdauer	141
8.	Vorpulse zur Bestimmung des Umkehrpotentials	143
9.	Einfluß der initialen extrazellulären $\text{K}^+$ -Konzentration	146
10.	Intrazelluläre $\text{K}^+$ -Konzentrationsänderung	147
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>149</b>
1.	$\text{Ca}^{2+}$ -Strom Messungen von Einzelfasern des <i>M. interosseus</i> der BALB/c Maus, Simulation der Konzentrationsverteilung und deren Auswirkungen auf den Stromverlauf	149



2.	Simulation des $K^+$ -Stroms und Vergleich mit experimentellen Daten von erschöpften Fasern des <i>M. semitendinosus</i> des Frosches <i>Rana temporaria</i> .	150
3.	Untersuchung der $K_{ATP}$ -Kanaldichte im TTS des <i>M. semitendinosus</i> des Frosches <i>Rana temporaria</i>	151
4.	Begründung der Wahl zugunsten des Scheibemodells von Adrian	151
5.	Auswahl und Wert der relevanten Parameter im Vergleich mit Literaturwerten	152
6.	Konvergenz des Algorithmus, Rechenzeit und adaptive Fehlergrenzen	159
7.	Stärken und Schwächen der neu entwickelten Methode	160
8.	Einfluß der intrazellulären Konzentrationsänderung	161
9.	Messung der extrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration	165
10.	Bei einigen Messungen der $Ca^{2+}$ -Ströme wurde eine „Zweite Komponente“ gefunden.	166
11.	Vergleich des Einflusses von Konzentrationsänderungen im TTS des Skelettmuskels mit dem Einfluß des Effekts bei anderen Zelltypen	167
12.	Zusammenfassung & Ausblick	169
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS</b>		<b>173</b>
<b>VII. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN</b>		<b>180</b>
<b>VIII. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</b>		<b>184</b>
1.	Originalarbeiten	184
2.	Abstracts	184
<b>IX. ANHANG</b>		<b>185</b>
<b>X. DANKSAGUNG</b>		<b>195</b>

# I. Einleitung

Mir ist bis heute kein auch noch so  
kompliziertes Problem begegnet,  
das nicht, richtig betrachtet,  
noch komplizierter wurde.

*Poul Anderson*

## 1. Historischer Kontext

Das Lebendige und dessen Zusammenhang mit der Elektrizität hat die Menschen schon immer fasziniert und zu Spekulationen und kontroversen Diskussionen animiert (Cole, 1972). Die erste - im heutigen Sinne - naturwissenschaftliche Publikation über die Existenz bio-elektrischer Signale konnte aufgrund von massiven Meinungsverschiedenheiten zwischen Alessandro Volta und Luigi Galvani nur über Umwege in einem 1794 erschienenen, anonymen Pamphlet veröffentlicht werden, in dem beschrieben wird, wie ein Muskel jedesmal kontrahiert, wenn die zuvor mit einem Glasstab entfernten Nervenfasern den Muskel wieder berühren (Fulton und Cushing, 1936). Das in italienischer Sprache verfaßte Manuskript ist heute verschollen und soll laut einer Aussage von Du Bois-Reymond teilweise in Galvanis Handschrift verfaßt gewesen sein (Needham, 1971). Somit wird das entscheidende Experiment zur Existenz bio-elektrischer Signale heute Galvani zugeschrieben, der damit die Forschung über die elektrischen Phänomene - die bereits 2600 v.Chr. bei den Ägyptern und ihren Studien am Zitterrochen *Malapterurus* ihren Anfang nahmen - an ihren damaligen Höhepunkt brachte, und somit den Grundstein für die physikalische Erforschung des lebenden Organismus legte.

Nach der Entdeckung des Ohmschen Gesetzes 1827 entwickelte sich eine Forschungsrichtung zur Untersuchung von Gewebe durch elektrische Stimulation und der durch motorische Aktivität entstehenden Ströme (Brazier, 1959), die auch zur Entwicklung neuer Meßinstrumente führte. Zur gleichen Zeit startete Mitte des 19. Jahrhunderts die Entwicklung der Kabeltheorie (siehe Taylor 1963 als Überblick) zur Beschreibung der passiven elektrischen Eigenschaften der Nerven und Muskeln. Sie wurde von Hermann nach seinen „Untersuchungen über die Entwicklung des Muskelstroms“ (Hermann, 1877) im Jahre 1905 durch das wesentlich komplexere „Alles-oder-Nichts“-Konzept erweitert (Hermann, 1905), das Lucas (1909) für Muskeln und E.D. Adrian (1914) für Nerven experimentell bestätigten.

Eine für die Elektrophysiologie entscheidende Neuerung war die Entwicklung der *Voltage-Clamp* Methode (siehe GRUNDLAGEN) mit deren Hilfe erstmals die zeitliche Entwicklung des Aktionspotentials von Nerven- und Muskelfasern mit intrazellulären Elektroden untersucht werden konnte (Hodgkin und Huxley, 1939). Durch die Messung des Membranstroms, der bei einer fest vorgegebenen Membranspannung fließt, können die spannungsabhängigen Leitfähigkeiten der Zellmembran bestimmt werden.

## 2. Allgemeine Fragestellung

Bei der Interpretation der mit Hilfe der *Voltage-Clamp* Methode ermittelten Daten tritt bei genauerer Betrachtung in einer in einer Vielzahl von biologischen Zellen ein großes Problem auf. Es handelt sich hierbei um die Bestimmung des Einflusses von durch den Ionenstrom selbst hervorgerufenen Konzentrationsänderungen. Diese Anreicherungen oder Verarmungen treten in Membran-Nähe und in Kompartimenten auf, bei denen nur ein mäßiger Austausch des umschlossenen Volumens mit dem Plasma möglich ist. Sie führen gemäß der Nernst-Gleichung zu einer Veränderung der treibenden Kraft für den Ionenstrom. Ein ideales Modellsystem zur Untersuchung solcher Konzentrationsänderungen bildet der Skelettmuskel mit seinem transversalen tubulären System (TTS; siehe GRUNDLAGEN).

Da bisher die direkte quantitative Untersuchung solcher geringer Fluktuationen der Ionenkonzentration experimentell noch nicht möglich ist (Egelmann und Montague, 1999; Zoghbi et al., 2000) soll eine neue Methode zur numerischen Untersuchung experimentell erfassbarer Daten entwickelt werden.

## 3. Spezielle Fragestellung

Die Familien der  $K^+$ -Kanäle und die der  $Ca^{2+}$ -Kanäle gehören zu den wichtigsten Modulatoren zellphysiologischer Regulation, nicht nur in tierischen, sondern auch in pflanzlichen Zellen. Im Rahmen der Biotechnologie bieten diese Kanäle „molekulare Tagets“ z.B. für Arzneimittel, pflanzliche Wirkstoffe und Umweltgifte, und können bei genetischen Veränderungen starke pathologische Veränderungen bis hin zum Zelltod verursachen. Die Möglichkeit solche Veränderungen im Tiermodell, z.B. in transgenen Mäusen, qualitativ und quantitativ zu untersuchen setzt voraus, daß die Ionenströme durch diese Kanaltypen sehr genau analysiert werden können. Dazu ist es notwendig, die Ionenkonzentrationsgradienten, die den elektrochemischen Gradienten bestimmen, möglichst genau zu ermitteln.

#### 4. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es daher, exemplarisch den Einfluß dieser Ionenkonzentrationsänderungen auf den Stromverlauf bei *Voltage-Clamp* Experimenten anhand von zwei unterschiedlichen Fragestellungen zu untersuchen.

##### a) $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme von kontrahierenden Muskelfasern

Bei der experimentellen Untersuchung der langsamen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme durch den L-Type DHP-Rezeptor ( $\text{I}_{\text{Ca}}$ ) einzelner Muskelfasern unter *Voltage-Clamp* Bedingungen wurde festgestellt, daß die Abnahme der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in isotoner  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung etwa drei mal schneller war, als bei Messungen, bei denen die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer konstant gehalten wurde (Friedrich, Ehmer, Fink, 1999). Es sollte eine Methode entwickelt werden, welche elektrophysiologische Messung, mathematische Modellierung und numerische Simulation kombiniert, um den Einfluß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentrationsänderungen auf den  $\text{I}_{\text{Ca}}$ -Stromverlauf zu quantifizieren.

Mit Hilfe der neu entwickelten Methode sollte es möglich sein aus den Strömen mit künstlich konstant gehaltener extrazellulärer Konzentration den Strom zu berechnen, der fließen würde, wenn die Konzentration nicht gepuffert worden wäre.

##### b) $\text{K}^+$ -Ströme von erschöpften Muskelfasern

Bei erschöpften Muskelfasern fließt der Membranstrom hauptsächlich durch die ATP-abhängigen Kaliumkanäle ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle), die im Normalzustand geschlossen sind und sich erst bei einer niedrigen ATP Konzentration öffnen (siehe GRUNDLAGEN).

Anhand des Vergleichs von Simulation und Messung des  $\text{K}^+$ -Stroms erschöpfter Muskelfasern soll mit Hilfe des Modells zum ersten Mal eine quantitative Abschätzung der Kanaldichte der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle in der TTS-Membran im Vergleich zur Kanaldichte der Oberflächenmembran ohne TTS-Membran getroffen werden.



## II. Grundlagen

In diesem Kapitel werden die notwendigen Grundlagen zusammengefaßt dargestellt, die zum Verständnis des Modells zur Untersuchung des Einflusses von Ionenkonzentrationsänderungen auf den Stromverlauf notwendig sind.

Hierbei wird in Abschnitt A der biophysikalisch-mathematische Hintergrund wie z.B. das Entstehen von Potentialen über einer Zellmembran und die mathematische Beschreibung der Potentialverteilung beim Anlegen einer externen Spannung beschrieben. Im folgenden Abschnitt B wird dann auf den medizinisch-physiologischen Hintergrund wie z.B. den Aufbau des Muskels und die Kontraktion eingegangen. Ebenso wird die Reizweiterleitung im transversen tubulären System vorgestellt, die letztendlich die Koordination einer kontrollierten Kontraktion beim Skelettmuskel gewährleistet.

## A. Biophysik

### 1. Die Anfänge

Im Jahr 1834 beschrieb Michael Faraday in einer Serie von Aufsätzen die „Zersetzung“ von Säuren, Basen, Salzen und Wasser durch elektrische Ströme (Faraday 1834). In seinen Arbeiten untersuchte er die Menge von Ablagerungen an den einzelnen Elektroden und die Massenströme, die elektrische Ladungen in einer Lösung transportieren. Er zeigte, daß die Massenverhältnisse von H, O, und Cl von 1:8:36 elektrochemisch äquivalent sind und nennt die beweglichen Ladungsträger *Ionen*. Mit dieser grundlegenden Arbeit prägt er eine neue Terminologie: Ion (*griech.*: „Wanderer“), Elektrode (*griech.*: „Weg für das Elektron“), Anode, Kathode, Anion, Kathion, Elektrolyt, Elektrolyse, elektrochemisches Äquivalent.

Hittorf hat quantitative Aussagen über die prozentuale Verteilung der Ströme verschiedener Ionen gemacht. Den Beitrag eines einzelnen Ions am Gesamtionenstrom nennt er Überföhrungszahl (*transport number*) des Ions. Im Allgemeinen sind die Überföhrungszahlen für jede Ionensorte unterschiedlich. Für 100 mm NaCl beträgt die Überföhrungszahl für  $\text{Na}^+$  0.39 und für  $\text{Cl}^-$  0.61. Das bedeutet, daß die Ströme mit unterschiedlicher Geschwindigkeit fließen. Kohlrausch untersuchte die Leitfähigkeit elektrolytischer Lösungen und stellte fest, daß jedes Ion einen charakteristischen Beitrag zum Gesamtstrom liefert und begründet somit das Gesetz von der Unabhängigkeit der Ionenbewegungen (Kohlrausch 1876). Die Leitfähigkeit einer Lösung ergibt sich durch die Summation über die partiellen Leitfähigkeiten jedes Ions, die Überföhrungszahlen ergeben sich als Quotient aus der partiellen und der gesamten Leitfähigkeit.

Arrhenius publizierte 1887 die Idee, daß Ionen in hinreichend verdünnten Lösungen vollständig dissoziiert sind und sich unabhängig voneinander bewegen. Auf der Grundlage von Helmholtz's Befund (elektrische Ladung ist immer ein Vielfaches der Elementarladung) stellten Max Planck und Walter Nernst eine Theorie auf, welche die Diffusion und die elektrische Leitfähigkeit in einer einzigen Theorie der Elektrodifffusion vereinigt.

### 2. Diffusion in wäßriger Lösung

Die Diffusion ist ein irreversibler Vorgang, bei dem ein gegebener Konzentrationsunterschied durch einen spontanen Materiefluß ausgeglichen wird. In einer Lösung fließt die Materie in die Richtung der niedrigeren Konzentration, das Lösungsmittel fließt in umgekehrter Richtung. Der Stromfluß ist ungefähr proportional zum Konzentrationsunterschied.

Der Materiefluß (bzw. auch Flux)  $J$  ist definiert als die Menge von Materie, die eine zur Flußrichtung senkrechte Einheitsfläche in einer Zeiteinheit durchquert. Die Dimension beträgt  $[J] = \text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Der Konzentrationsgradient  $\partial C/\partial x$  bezeichnet die Rate des Konzentrationsanstiegs mit der Entfernung, gemessen in Richtung des Flusses. Der Diffusionskoeffizient  $D$  wird durch das Ficksche Gesetz beschrieben:

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x}. \quad (1)$$

Die partielle Ableitung wird benutzt, da die Konzentration orts- und zeitabhängig ist. Das negative Vorzeichen ist Konvention und wurde so gewählt, daß der Diffusionskoeffizient positive Werte annimmt. Die Diffusion (bzw. Flux) eines Stoffes der Sorte  $i$  wird durch den Gradienten des chemischen Potentials  $d\mu_i/dx$  hervorgerufen.

#### a) Stationärer Zustand

Im stationären Zustand wird sich ein Gleichgewicht zwischen dieser treibenden Kraft  $F_d$  und dem Flux  $J$  einstellen. Das Verhältnis kann ganz allgemein durch eine Potenzreihe dargestellt werden:

$$J = A + B \cdot F_d + C \cdot F_d^2 + \dots,$$

wobei  $A$ ,  $B$ , und  $C$  Konstanten sind. Falls die Kraft  $F_d$  klein genug ist, können die Terme höherer Ordnung vernachlässigt werden., es gilt also:

$$J = A + B \cdot F_d. \quad (2)$$

Die Konstante  $A$  muß gleich Null sein, da ohne Kraft ( $F_d = 0$ ) kein differentieller Flux auftreten kann.

Somit besteht für hinreichend kleine Kräfte ein linearer Zusammenhang zwischen Diffusions-Flux und treibender Kraft, d. h. chemischem Gradienten:

$$J = B \cdot F_d. \quad (3)$$

Die treibende Kraft für 1 mol Teilchen des Stoffes  $i$  ist  $-(d\mu_i/dx)$ . Wenn  $C_i$  die Konzentration des Stoffes  $i$  bezeichnet, ergibt sich:

$$J = -B \cdot C_i \frac{d\mu_i}{dx} \quad (4)$$

oder, da das chemische Potential  $\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln C_i$ :



$$J = -BC_i RT \frac{d \ln C_i}{dx} = -BRT \frac{dC_i}{dx}. \quad (5)$$

Durch Kombination der Gleichung mit Gleichung (1) erhält man den Zusammenhang, der auch als erstes Ficksches Gesetz bekannt ist:

$$D = BRT. \quad (6)$$

### b) Zeitabhängige Gleichung

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Konzentrationsverteilung kann die obige Gleichung (5) in eine Differentialgleichung zweiter Ordnung überführt werden.

Bei der Betrachtung eines Parallelelepipeds mit einer Einheitsfläche und der Länge  $dx$  können Teilchen durch die Fläche  $A$  eindiffundieren und durch die Fläche  $B$  ausdiffundieren. Wenn  $C$  die Konzentration der Teilchen an der Fläche  $A$  bezeichnet, dann ist die Konzentration an der Fläche  $B$  gegeben durch  $C + (dc/dx) \cdot dx$ . Der Flux  $J_A$  an der Fläche  $A$  wird durch Gleichung (1) beschrieben, es gilt somit:

$$J_A = -D \frac{\partial C}{\partial x}$$

und der Flux  $J_B$  durch Fläche  $B$  ist:

$$\begin{aligned} J_B &= -D \frac{\partial}{\partial x} \left( C + \frac{\partial C}{\partial x} \cdot dx \right) \\ &= -D \frac{\partial C}{\partial x} - D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \cdot dx. \end{aligned} \quad (7)$$

Der Nettoflux durch das Parallelelepipiped vom Volumen  $dx$  ist:

$$J_A - J_B = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \cdot dx, \quad (8)$$

und somit der Nettoflux pro Einheitsvolumen:

$$\frac{J_A - J_B}{dx} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}. \quad (9)$$

Da  $J_A - J_B/dx$  die Rate der zeitlichen Konzentrationsänderung ist, folgt

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}. \quad (10)$$

Für die Beschreibung der Diffusion in drei Dimensionen nehmen die Gleichungen die Form

$$J = -D \cdot \text{grad } C \quad (11)$$

und

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \text{div}(D \cdot \text{grad } C) \quad (12)$$

an.

Die Diffusion kann unter dem Blickwinkel einer kinetischen Betrachtungsweise auch als zufällige Zickzack Bewegung (*“random walk”*) eines Teilchens im dreidimensionalen Raum aufgefaßt werden. Den Zusammenhang zwischen der Diffusionskonstante  $D$  und der zurückgelegten Strecke  $\langle x^2 \rangle$  nach einer Zeit  $t$  wird durch die Einstein-Smolchowski Gleichung beschrieben:

$$D = \frac{\langle x^2 \rangle}{2 \cdot t}. \quad (13)$$

Sie knüpft die Verbindung zwischen der mikroskopischen Betrachtung des *random walk* und der makroskopischen Beschreibung der Diffusionskonstante durch das Ficksche Gesetz.

### 3. Diffusion und Mobilität

Bei der Betrachtung von Elektrolyt-Lösungen, bei denen ein zusätzliches elektrisches Feld  $E$  anliegt, bekommen die *random-walk* Ionen eine zusätzliche Geschwindigkeit  $v_d$  aufgrund des anliegenden elektrischen Feldes. Ihre Mobilität  $u$  kann geschrieben werden als:

$$u = \frac{v_d}{E}. \quad (14)$$

Die Stromdichte einer Ionensorte  $j$  mit der Konzentration  $C_j$ , Driftgeschwindigkeit  $v_j$  und Flux  $J_j = v_j \cdot C_j$  kann geschrieben werden als:

$$I_j = z_j F C_j v_j \quad (15)$$

wobei  $z_j$  die Valenz des Ions ist und  $F$  die Faradaykonstante.

Die totale Stromdichte, die durch alle Ionen getragen wird, ist somit gegeben durch:

$$I = \sum_j I_j = \sum_j z_j F C_j v_j \quad (16)$$

bzw.

$$I = \sum_j I_j = \sum_j z_j F C_j u_j E. \quad (17)$$

#### 4. Elektrodifffusion: Die Nernst-Planck-Gleichung

Bei der Elektrodifffusion wirken zwei treibende Kräfte, die einen Fluß verursachen: ein Konzentrationsgradient und ein elektrisches Potential. Im Folgenden wird eine Membran der Dicke  $l$  (in cm) in zwei gut durchmischten Ionenlösungen betrachtet, weiterhin wird die Konzentration  $C_j$  der Ionensorte  $j$  mit dem Symbol  $[J]$  bezeichnet.

Die Konzentration  $C_j$  des Ions  $j$  im Inneren eines Kompartiments sei mit  $[J]_i$  und die Konzentration außerhalb mit  $[J]_o$  bezeichnet. Wie bereits im vorherigen Abschnitt dargestellt, ist die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Ionen der Stärke des angelegten elektrischen Feldes  $E$  proportional. Den Proportionalitätsfaktor nennt man Beweglichkeit. Im Weiteren werden folgende Variablen benutzt:

<i>Symbol (Dimension)</i>	<i>Bedeutung</i>
$z_j$ (dimensionslos)	Valenz des Ions $j$
$u_j$ ((cm/s) / (V/cm))	Beweglichkeit von Ion $j$ in der Membran
$f_j$ (dyn / (cm/s))	Molekularer Reibungskoeffizient
$\Psi$ (V)	Lokales Potential in der Membran
$E$ (V)	Membranpotentialdifferenz
$I_j$ (A/cm <sup>2</sup> )	Ionenstromdichte pro Einheitsfläche

Wenn nur ein elektrisches Feld anliegt, wandern die Ionen entlang des Potentialgradienten. Die molare Flußdichte ist proportional zum elektrischen Feld:

$$J_j = -z_j u_j C_j \frac{d\Psi}{dx}. \quad (18)$$

Die Stromdichte erhält man durch Multiplikation mit der Faradaykonstanten  $F$  und der Valenz der Ionen:

$$I_j = z_j F J_j = -z_j^2 F u_j C_j \frac{d\Psi}{dx}. \quad (19)$$

Unter der Annahme, daß sowohl die Beweglichkeit  $u_j$ , als auch das elektrische Feld  $d\Psi/dx$  unabhängig von  $x$  sind (d. h.  $\frac{\partial u_j}{\partial x} = 0$  und  $\frac{\partial E}{\partial x} = \frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} = 0$ ), kann die Ableitung durch  $E/l$  ersetzt werden und man erhält das Ohm'sche Gesetz:

$$I_j = -\frac{z_j^2 F u_j C_j}{l} E. \quad (20)$$

Die Nernst-Einstein Beziehung zwischen der Beweglichkeit  $u_j$  und dem Diffusionskoeffizienten  $D_j$  besagt, daß sich die Diffusion aus thermischer Bewegung und Reibung zusammensetzt:

$$D_j = \frac{kT}{f_j} = \frac{RT}{F} u_j. \quad (21)$$

Nernst (1888) und Planck (1890) nutzten diesen Zusammenhang zwischen  $D_j$  und  $u_j$  und kombinierten das Ficksche Gesetz

$$J_j = -D_j \frac{\partial C_j}{\partial x} \quad (22)$$

und das Ohm'sche Gesetz (Glg. 20) zu einer einzigen Gleichung, der Nernst-Planck Differentialgleichung:

$$I_s = -z_s F D_s \left( \frac{dC_s}{dx} + z_s \frac{F}{RT} C_s \frac{d\Psi}{dx} \right). \quad (23)$$

Für den Gleichgewichtszustand, d.h. wenn kein Nettostrom fließt (und somit  $I_j = 0$ ), muß gelten:

$$\left( \frac{dC_j}{dx} + \frac{F z_j C_j}{RT} \frac{d\Psi}{dx} \right) = 0. \quad (24)$$

Durch Umstellen erhält man:

$$\frac{d\Psi}{dx} = -\frac{RT}{z_j F} \frac{1}{C_j} \frac{dC_j}{dx} = -\frac{RT}{z_j F} \frac{d}{dx} (\ln C_j). \quad (25)$$

Durch Integration über  $dx$  erhält man die Nernst-Gleichung (Glg. 29), die das Gleichgewichtspotential eines Ions angibt.

## 5. Ionenverteilung und Gleichgewichtspotential, Herleitung der Nernst-Gleichung

Die Boltzmann-Gleichung beschreibt die Wahrscheinlichkeit  $p_i$  ein Teilchen im Zustand 1 oder im Zustand 2 zu finden, wenn eine Energiedifferenz  $u_2 - u_1$  herrscht (siehe z.B. Römer und Filk, 1994 und Landau und Lifschitz, 1991):

$$\frac{p_2}{p_1} = \exp\left(-\frac{u_2 - u_1}{kT}\right). \quad (26)$$

Werden die Wahrscheinlichkeiten  $p_i$  durch die Konzentrationen  $C_i$  und die Einteilchenenergie  $u_i$  durch die molare Energie  $U_i$  ersetzt, ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{C_2}{C_1} = \exp\left(-\frac{U_2 - U_1}{RT}\right), \quad (27)$$

wobei  $R$  die allgemeine Gaskonstante ist ( $R=kN_A$ ,  $N_A$  ist die Avogadro-Konstante). Durch Logarithmieren erhält man sofort:

$$U_1 - U_2 = RT \ln \frac{C_2}{C_1}. \quad (28)$$

In diesem Fall ist  $U_1 - U_2$  die molare Energiedifferenz eines permeablen Ions, die durch die Potentialdifferenz  $E_1 - E_2$  verursacht wird. Für eine beliebige Ionensorte  $J$  mit einer Ladungszahl  $z_j$  wird  $U_1 - U_2$  ersetzt durch  $z_j F(E_1 - E_2)$ . Dann ergibt sich durch Substitution das folgende Gleichgewichtspotential  $E_j$ :

$$E_j = E_1 - E_2 = \frac{RT}{z_j F} \ln \frac{[J]_1}{[J]_2}. \quad (29)$$

Diesen Zusammenhang nennt man Nernst-Gleichung (Nernst 1888).

## 6. Fasermodell, elektrophysiologische Eigenschaften

Bei der Beschreibung der Strom- und Spannungsverteilung in Nerven und Muskeln dient das sogenannte *core-conductor* (dt. etwa Kabel-Ader) Modell als Grundlage. Die Gleichung ist auch unter dem Namen Telegraphengleichung bekannt und wurde erstmals von Lord Kelvin im Jahr 1855 aufgestellt und gelöst. Die Ader des Kabels wird z.B. durch eine dünne Membranröhre gebildet, die mit einer elektrisch leitenden Lösung (z.B. Myoplasma) gefüllt ist und sich in einem weiteren elektrisch leitfähigen Medium (z.B. extrazelluläre Ringerlösung) befindet.

Die Länge der Ader ist viel größer als deren Durchmesser, und der Widerstand der Membran ist groß im Vergleich zum Längswiderstand der Aderlösung (hier Myoplasma). Daraus folgt, daß der Strom weite Strecken innerhalb des Kabels fließen wird, bevor er durch die Membran

sichert. Die Symbole und deren Bedeutung zur Beschreibung des Modells werden in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>
$V_e$	Elektrisches Potential an der Außenseite (extrazellulär) der Membran (V)
$V_i$	Elektrisches Potential an der Innenseite (intrazellulär) der Membran (V)
$V_m = V_i - V_e$	Membranspannung
$E_r$	Ruhemembranpotential (Goldmann-Gleichung)
$V = V_m - E_r$	Elektrotonisches Potential, auch driving force, d.h. Ausmaß der Abweichung vom Ruhemembranpotential
$V_0$	Spannung bei $x=0$ zur Zeit $t=0$
$R_i$	Spezifischer Widerstand (resistivity) des Intrazellulärmediums ( $\Omega\text{cm}$ )
$R_m$	Flächenwiderstand einer Einheitsfläche aus Membran ( $\Omega\text{cm}^2$ )
$C_m$	Kapazität pro Einheitsfläche an Membran ( $\text{Fcm}^{-2}$ )
$a$	Faserradius, Radius des Zylinders (cm)
$r_i$	Innenwiderstand pro Einheitslänge (core resistance) ( $\Omega\text{cm}^{-1}$ )
$r_e$	Widerstand pro Einheitslänge des Extrazellulärmediums ( $\Omega\text{cm}^{-1}$ )
$r_m$	Widerstand über einer Einheitslänge der passiven Membran ( $\Omega\text{cm}$ )
$c_m$	Membrankapazität pro Einheitslänge des Zylinders ( $\text{Fcm}^{-1}$ )
$\lambda = \sqrt{r_m / (r_e + r_i)}$	Längenkonstante der Kabel-Ader (cm)
$\tau_m = r_m c_m = R_m C_m$	Passive Membran Zeitkonstante (s)
$I_i$	Strom, der intrazellulär innerhalb der Kabel-Ader fließt (A)
$I_e$	Strom, der extrazellulär parallel zur Zylinderachse fließt (A)
$i_m$	Membranstrom pro Einheitslänge ( $\text{Acm}^{-1}$ )
$I_m = i_m / 2\pi a$	Membranstromdichte ( $\text{Acm}^{-2}$ )

**Tabelle 1:** Symbole, die in der Kabeltheorie benutzt werden

## 7. Lineare Kabeltheorie

Die von Lord Kelvin aufgestellte Gleichung für die Potentialverteilung  $V(x, t)$  im Inneren des Kabels lautet :

$$\frac{1}{r_i} \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = \frac{V}{r_m} + c_m \frac{\partial V}{\partial t}, \quad (30)$$

oder durch Substitution von  $r_m c_m (= \tau_m)$  und von  $r_m / r_i = \lambda^2$

$$\lambda^2 \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} - V - \tau_m \frac{\partial V}{\partial t} = 0. \quad (31)$$

Bei der Herleitung wurde davon ausgegangen, daß das extrazelluläre Potential konstant war, und somit  $\partial V_e / \partial x = 0$ . Falls das nicht so ist, gilt allgemeiner formuliert (Lakshminarayanan, 1983):

$$\frac{\partial V}{\partial x} = \frac{\partial V_i}{\partial x} - \frac{\partial V_e}{\partial x}, \quad (32)$$

wobei mit der Beziehung  $I_e r_e = -\partial V_e / \partial x$  folgt:

$$\frac{\partial V}{\partial x} = -I_i r_i + I_e r_e. \quad (33)$$

Die Widerstände  $r_i$  und  $r_e$  sind unabhängig von  $x$ . Durch nochmaliges Differenzieren erhält man daher:

$$\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = -r_i \frac{\partial I_i}{\partial x} + r_e \frac{\partial I_e}{\partial x}. \quad (34)$$

Ohne Anlegen eines externen Stroms gilt wegen der Erhaltung des Stroms:

$$i_m = -\frac{\partial I_i}{\partial x} = \frac{\partial I_e}{\partial x}. \quad (35)$$

Setzt man beide Gleichungen ineinander ein, ergibt sich

$$\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = i_m (r_i + r_e). \quad (36)$$

Somit lautet die Differentialgleichung die den Spannungsverlauf entlang eines Kabels (*leaky cable*) für den stationären Zustand beschreibt:

$$\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = \frac{r_e + r_i}{r_m} \cdot V \quad (37)$$

und hat die Lösung

$$V = A \exp(-x/\lambda) + B \exp(x/\lambda), \quad (38)$$

oder auch

$$V = A \sinh(x/\lambda) + B \cosh(-x/\lambda) \quad (39)$$

mit der Längenkonstante

$$\lambda = \sqrt{r_m / (r_i + r_e)}. \quad (40)$$

Mit den Randbedingungen (Spannung im Unendlichen = 0) und Anfangsbedingungen ( $V=V_0$  bei  $x=0$ ) gilt für das „halbunendliche“ Kabel (d.h.  $x = 0$  bis  $x = +\infty$ ) insgesamt:

$$V = V_0 \exp(-x/\lambda). \quad (41)$$

## 8. Das kurze Kabel

Für ein Kabel mit endlicher Länge und vernachlässigbarem  $r_e$  (also bei hinreichend hoher Leitfähigkeit des Extrazellulärmediums) gilt (Falk & Fatt 1964):

$$R = \frac{1}{2} \sqrt{r_i r_m} \coth(l/\lambda) \quad (42)$$

und für das Verhältnis der Spannung bei  $x$  zur Spannung bei  $x=0$  (Fasermitte) (Jack et al., 1983):

$$\frac{V(x)}{V_{x=0}} = \frac{\cosh((l-x)/\lambda)}{\cosh(l/\lambda)}. \quad (43)$$

Am Faserende bei  $x = \pm l/2$  gilt also:

$$K := \frac{V(l/2)}{V_{x=0}} = \frac{\cosh(l/(2\lambda))}{\cosh(l/\lambda)}. \quad (44)$$

Wenn man jetzt  $r_m = R_m / 2\pi a$  und  $r_i = R_i / \pi a^2$  (mit  $a$ =Faserradius) in die Gleichung für  $\lambda$  (Glg. 40) einsetzt und ein konstantes Faservolumen von  $V_{faser} = l \cdot \pi \cdot a^2$  annimmt, erhält man

$$\lambda(a) = \sqrt{\frac{R_m}{2R_i}} a \quad (45)$$

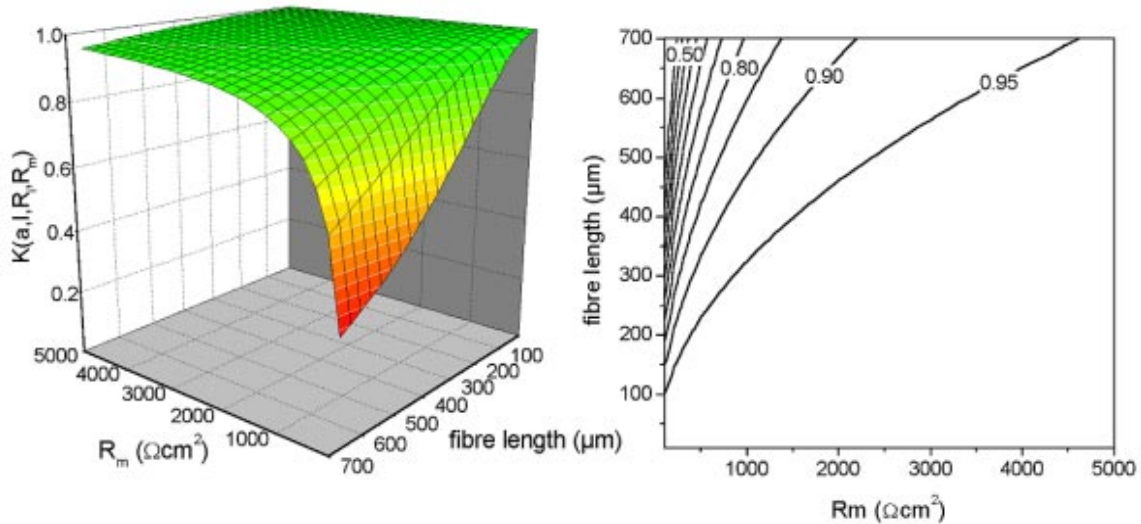
oder

$$\lambda(a) = \sqrt{\frac{R_m}{2R_i}} \sqrt{\frac{V_{faser}}{l\pi}}. \quad (46)$$

Die folgende Abbildung zeigt, wie sich das Spannungsverhältnis  $K$  in Abhängigkeit von der Faserlänge  $l$  und dem Membranflächenwiderstand  $R_m$  verhält. Dabei wurde ein Faserradius von  $a=24 \mu\text{m}$  und ein Wert für  $R_i=160 \Omega\text{cm}$  (Adrian et al., 1970) angenommen. Anhand die-



ses Diagramms lässt sich eine Abschätzung für die Güte der Spannungskontrolle beim 2-MVC (2 Mikroelektroden Voltage-Clamp) über der gesamten Faserlänge durchführen.



**Abbildung 1:** Abschätzung der Güte der Spannungskontrolle für eine Einzelfaser mit Radius  $a=24 \mu\text{m}$  Links: 3-dimensionale Darstellung (Aus Ehmer, 1997 und Friedrich et al., 1999), rechts: Kontur-Plot.

Das Diagramm zeigt, daß bei einem  $R_m$  von  $3000 \Omega\text{cm}^2$  (Sanches & Stefani 1978) und einem Radius von  $a=24 \mu\text{m}$  bis zu einer Faserlänge  $l$  von über  $560 \mu\text{m}$  das lokale Membranpotential am Faserende weniger als 5% von der Klemmspannung in der Fasermite abweicht und somit in erster Näherung von einer einheitlich depolarisierten Faser ausgegangen werden kann.

## 9. Punktförmige Stromquelle

Wenn der Strom durch eine Mikropipette in eine Muskelfaser appliziert wird, kann die Stromquelle als punktförmig betrachtet werden. Mathematisch wird diese Abweichung von der *steady state* Potentialverteilung durch eine Greenfunktion beschrieben, die eine Lösung der folgenden dreidimensionalen Differentialgleichung in Zylinderkoordinaten

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial V}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 V}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = 0 \quad (47)$$

mit den Anfangsbedingungen

$$\left. \frac{\partial V}{\partial r} \right|_{r=a} + \frac{R_i}{R_m} V_m = 0 \quad (48)$$

ist (Adrian et al., 1969b; Eisenberg und Johnson, 1970; Peskoff et al., 1973).

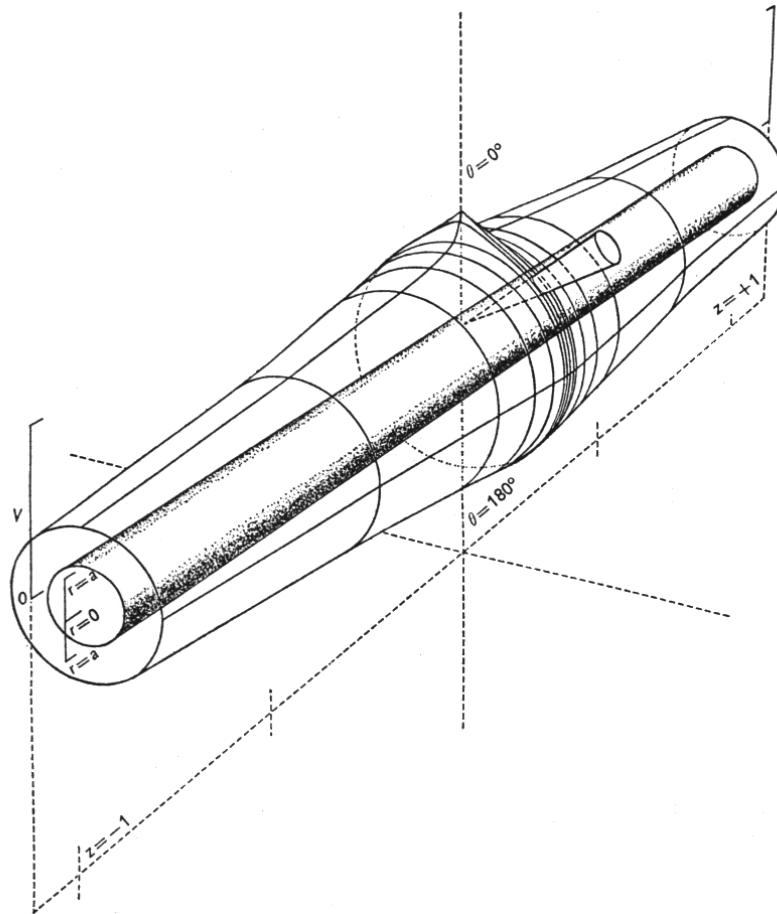
Die Lösung ist in Abbildung 2 dargestellt und lautet:

$$V_{r=a} = \frac{I_0 R_i}{2\pi a} \sum_{-\infty}^{+\infty} \cos n\theta \cdot \sum_{\beta} \frac{\beta \exp(-\beta x/a) J_n(\beta r'/a)}{[\beta^2 - n^2 + \frac{1}{4}(a/\lambda)^4] \cdot J_n(\beta)}, \quad (49)$$

wobei  $J_n(\ )$  die Besselfunktionen erster Art und  $n$ -ter Ordnung sind, und  $\beta$  die positiven Lösungen der Gleichung

$$\frac{\beta J_{n-1}(\beta)}{J_n(\beta)} = n - \frac{a^2}{2\lambda^2}$$

sind mit dem Faserradius  $a$  und der Längskonstante  $\lambda$ .



**Abbildung 2:** Dreidimensionale Darstellung des Potentials  $V_{r=a}$  (siehe Glg. 49) über einer Membran eines Zylinders mit spezifischem Widerstand  $R_i$  (200  $\Omega\text{cm}$ ) und Membranwiderstand  $R_m$  (1000  $\Omega\text{cm}^2$ ). Der Strom wird durch die Spitze einer Mikropipette geliefert, die in die Faser eindringt (punktförmige Quelle). Die Koordinaten der Quelle sind:  $x'=0$ ,  $\theta'=0^\circ$ ,  $r'=0.9a$ , Faserradius  $a=50\ \mu\text{m}$ . Das Potential wird als radialer Abstand der äußeren Fläche von der Zylinderfläche dargestellt (aus Adrian et al., 1969b).

## 10. Voltage-Clamp – Prinzip

Bei der Voltage-Clamp Technik wird das Membranpotential auf einem konstanten Potential fest gehalten (geklemmt), während durch die Membran Ionenströme fließen. Dabei ist der Strom durch die Membran eher von sekundärem Interesse, vielmehr erlaubt die *Voltage-Clamp* Technik die Leitfähigkeitsänderungen der Membran zu untersuchen. Somit können Rückschlüsse über die Aktivitäten der Ionenkanäle und über die Ionenkanalleitfähigkeiten gewonnen werden. Da die Leitfähigkeit nicht direkt gemessen werden kann, wird der Strom durch die Membran aufgenommen. Durch das konstante Potential wird sichergestellt, daß der Strom proportional der Leitfähigkeit ist. Um die gesamte Zelle zu messen (*Whole-Cell*) wird üblicherweise mit zwei Elektroden gearbeitet: eine Elektrode zur Spannungsmessung und eine weitere Elektrode zur Stromapplikation.

### a) Ideale Spannungsklemme

Die idealisierte Spannungsklemme besteht aus einer Batterie, einem Schalter, einem idealisierten Kabel ohne Widerstand, der Zelle und einem Ampèremeter. Sobald der Schalter geschlossen wird, ändert sich das Membranpotential instantan auf die Spannung der Batterie. Somit wird einen Stromimpuls generiert, der die Membrankapazität umlädt. Direkt im Anschluß fließt ein *steady state* Strom  $I_m = V_{cmd} / R_m$ , der benötigt wird, um die Spannung über dem Membranwiderstand aufrecht zu erhalten.

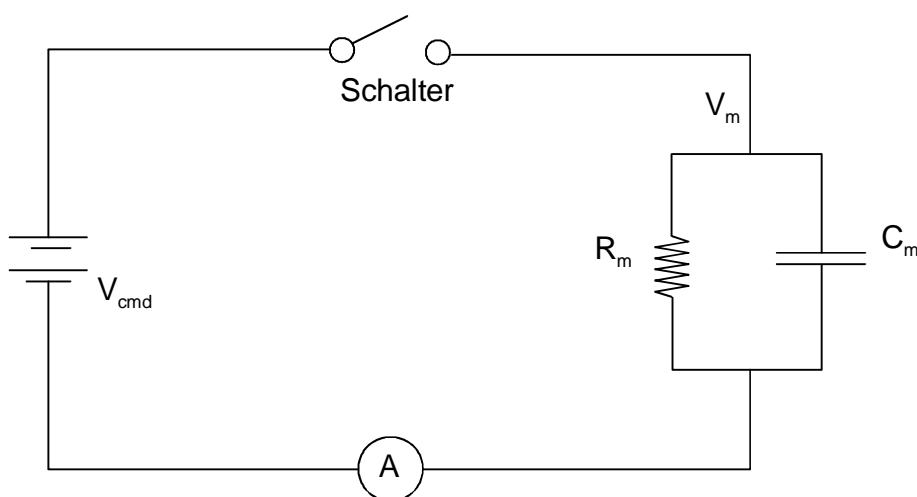


Abbildung 3: Ideale bzw. idealisierte Spannungsklemme (nach [Axonguide, 1993]).

In diesem idealisierten Experiment ist die Klemmspannung  $V_{\text{cmd}}$  die unabhängige Variable. Sie hat den Wert der Batteriespannung und wird durch die Batteriespannung kontrolliert bzw. vorgegeben. Da der Membranstrom die abhängige Variable ist, wird diese Schaltung auch Stromfolge-Schaltung („*current follower*“) genannt. Sobald der Schalter geschlossen wird, nimmt das Membranpotential  $V_m$  sofort den Wert der Batteriespannung  $V_{\text{cmd}}$  an. Es wird ein Strom fließen, der eine Ladung  $Q$  transportiert, die den Kondensator der Kapazität  $C_m$  umlädt. Der Strom im stationären Zustand ist  $V_{\text{cmd}} / R_m$ .

### *b) Reale Spannungsklemme*

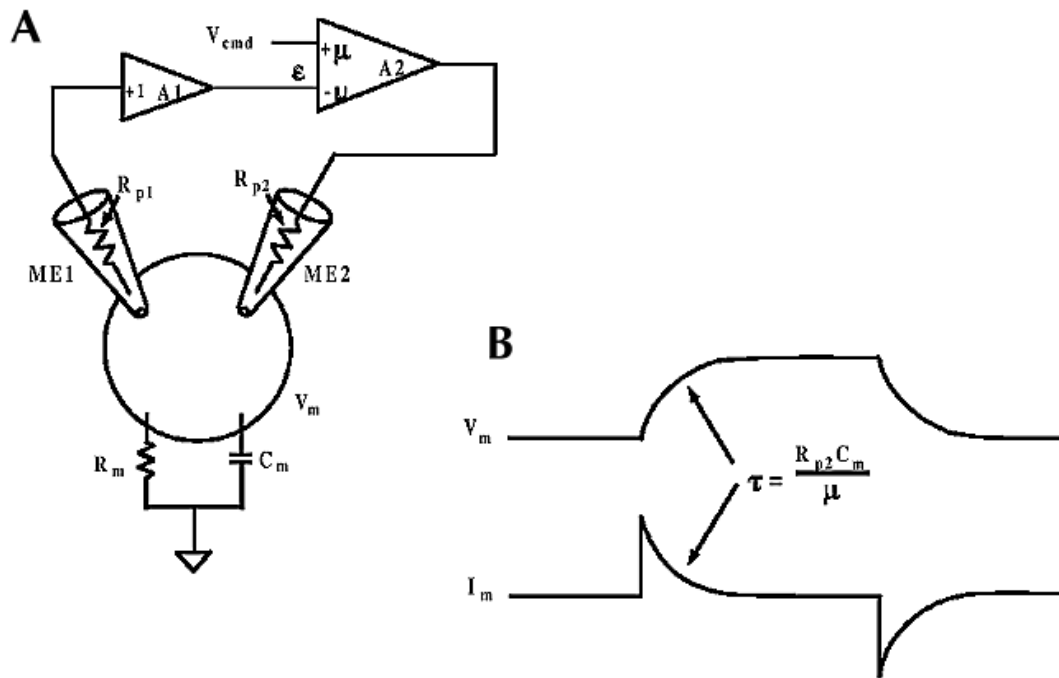
In der Realität unterliegt die reale Spannungsklemme einigen prinzipiellen Beschränkungen. So ist z.B. der Widerstand der Strom applizierenden Elektrode endlich, die spannungsmessende Elektrode hat eine limitierte Bandbreite (aufgrund der Fourier-Theorie kann somit kein idealer Rechteckpuls aufgenommen werden, siehe z.B. Stöbel, 1993 und Davis, 1994). Weiterhin besteht eine kapazitive Kopplung zwischen den Elektroden, der Verstärker hat eine limitierte Bandbreite und es kommt zu nichtlinearen Phasenverschiebungen in der Zellmembran. Diese Phasenverschiebungen der Zellmembran können wiederum zu Strukturuntersuchungen herangezogen werden. Eine sehr detaillierte Beschreibung findet sich in den Arbeiten von Bob Eisenberg (siehe z.B. Eisenberg, 1983 als Übersicht).

Weitere Details zur prinzipiellen Beschränkung der Güte der Spannungsklemme sind sehr ausführlich im Axonguide (1993) beschrieben.

## **11. Die 2 Mikroelektroden *Voltage-Clamp* Methode(2-MVC)**

Die Theorie der zwei Mikroelektroden *Voltage-Clamp* wird sehr detailliert von Finkel und Gage (1985) beschrieben. In diesem Abschnitt wird das zugrundeliegende Prinzip kurz dargestellt, da die elektrophysiologischen Messungen der in dieser Arbeit vorgestellten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme mit dieser Methode durchgeführt wurden.

Die folgende Abbildung zeigt eine konventionelle 2-MVC. Hierbei wurden mehrere frequenzabhängige Komponenten zur Vereinfachung nicht dargestellt. Dies sind die Kapazität der Mikropipette ME1, die Kapazität zwischen den Elektroden und die Kapazitäten und Phasenverschiebungen, die durch die Meßelektronik hervorgerufen werden.



**Abbildung 4:** Konventionelle Zwei-Mikroelektroden Voltage-Clamp (nach Axonguide; 1993). A) Schaltbild, B) Spannungs- und Stromverlauf beim Anlegen der Klemmspannung.

Das Membranpotential  $V_m$  wird von einem Vorverstärker bzw. Impedanzwandler (A1, Verstärkungsfaktor 1) aufgenommen, der an die spannungsmessende Mikroelektrode (ME1) angeschlossen ist. Die gemessene Spannung  $V_m$  wird in einem Differenzenverstärker (A2, Verstärkungsfaktor  $\mu$ ) mit dem Kommandopotential bzw. der Sollspannung ( $V_{cmd}$ ) verglichen. Der Ausgang von A2 ist der Differenz  $\epsilon$  zwischen  $V_m$  und  $V_{cmd}$  proportional. Die Spannung am Ausgang von A2 resultiert in einem Strom, der durch die stromapplizierende Elektrode ME2 in die Zelle fließt. Das Vorzeichen der Spannung ist so gewählt, daß der Strom durch ME2 die Differenz  $\epsilon$  minimiert. In B) sind die realen Strom- und Spannungsantworten beim Anlegen einer Klemmspannung an eine Zelle gezeigt. Hier wird deutlich, daß im Gegensatz zum idealisierten Fall eine endliche Zeit benötigt wird, um die Kapazität der Zelle umzuladen. Die Zeitkonstante ist gegeben durch

$$\tau = \frac{R_{p2} \cdot C_m}{\mu} \quad (50)$$

wobei  $R_{p2}$  der Widerstand der stromapplizierenden Elektrode ME2 ist. Für einen unendlichen Verstärkungsfaktor  $\mu \rightarrow \infty$  oder einen Nullwiderstand  $R_{p2} \rightarrow 0$  resultiert der idealisierte Fall einer Rechteck-Spannung.

## 12. Stromdichtemessungen mit der 3-MVC

Die Messungen der  $K^+$ -Ströme an den erschöpften Froschfasern wurden teilweise auch mit der von Adrian, Chandler und Hodgkin (1970) entwickelten 3 Mikroelektroden Voltage-Clamp (3-MVC) Methode aufgenommen, die eine direkte Messung der Membranstromdichte  $I_m$  (in A/cm<sup>2</sup>) erlaubt. Dabei werden 3 Elektroden im Abstand  $x=l$ ,  $2l$  und  $2l+l'$  vom Ende einer Muskelfaser ( $x=0$ ) eingestochen. Üblicherweise ist der Abstand  $l$  klein im Vergleich zur Längenkonstante  $\lambda$ . Im stationären Zustand ist bei einer linearen Membranleitfähigkeit pro Einheitslänge ( $g_m$ ) die Spannungsverteilung durch die Kabelgleichung vorgegeben (Adrian et al. 1970):

$$V(x) = V_0 \cosh(x/\lambda), \quad (51)$$

wobei die Längenkonstante  $\lambda = (r_i \cdot g_m)^{-1/2}$ . Die Spannungen bei  $x=l$  und bei  $x=2l$  werden mit  $V_1$  bzw.  $V_2$  bezeichnet. Üblicherweise wird der Membranstrom  $i_m$  (in A/cm), der bei der Kontrollspannung  $V_1$  fließt, benötigt. Mit der Spannungsdifferenz

$$\Delta V = V_2 - V_1 = V_0 [\cosh(l/2\lambda) - \cosh(l/\lambda)] \quad (52)$$

und

$$V_0 = i_m / [g_m \cosh(l/\lambda)] \quad (53)$$

folgt

$$\Delta V = V_0 \frac{i_m}{g_m} \frac{\cosh(l/2\lambda) - \cosh(l/\lambda)}{\cosh(l/\lambda)}, \quad (54)$$

oder durch Entwicklung des *cosinus hyperbolicus* als Potenzreihe<sup>1</sup>

$$\Delta V = \frac{i_m}{g_m} \cdot \frac{\frac{3}{2!} \left(\frac{l}{\lambda}\right)^2 + \frac{15}{4!} \left(\frac{l}{\lambda}\right)^4 \dots}{1 + \frac{1}{2!} \left(\frac{l}{\lambda}\right)^2 \dots} \quad (55)$$

wobei für ein hinreichend kleines  $l/\lambda$  gilt:

$$\Delta V \cong \frac{3i_m l^2}{2g_m \lambda^2} \quad (56)$$

---

<sup>1</sup>  $\cosh x = 1 + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^4}{4!} + \frac{x^6}{6!} + \dots + \frac{x^{2n}}{(2n)!} + \dots$  mit Konvergenzbereich  $|x| < \infty$

und somit der Membranstrom  $i_m$  (in A/cm) geschrieben werden kann als:

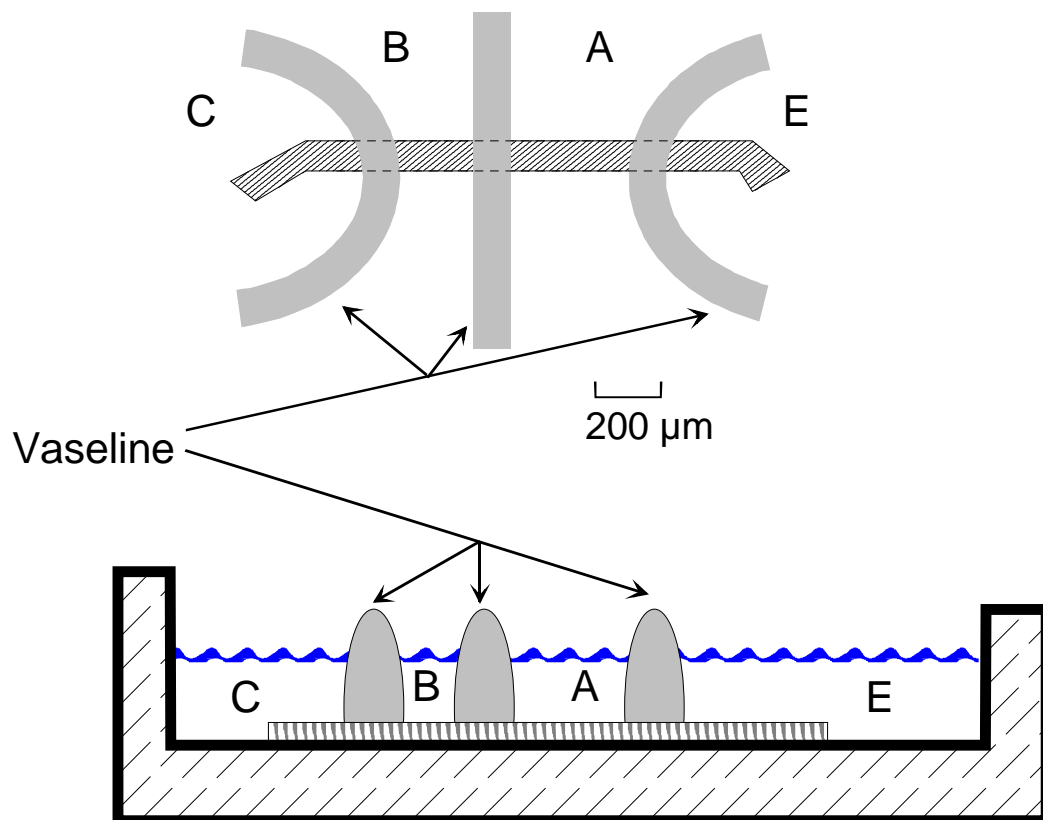
$$i_m \cong \frac{2\Delta V}{3r_i l^2}. \quad (57)$$

Mit den aus der Kabeltheorie (siehe Abschnitt 7, Seite 17) bekannten Zusammenhängen  $r_i = R_i / \pi a^2$  und  $I_m = i_m / 2\pi a$  ist die Membranstromdichte  $I_m$  (in A/cm<sup>2</sup>) somit wie folgt definiert:

$$I_m \equiv \frac{a(V_2 - V_1)}{3l^2 R_i} \quad (58)$$

### 13. Kontrolle der intrazellulären Lösung, die *Vaseline-Gap* Methode

Mit Hilfe der von Hille und Campbell (1976) entwickelten *Vaseline-Gap* Methode ist es möglich, makroskopische Ionenströme bei gleichzeitiger Kontrolle der intrazellulären Lösung zu messen. Dabei wird ein etwa 2 mm langes Stück aus einer Muskelfaser herausgeschnitten und in einer speziellen Meßkammer mit drei etwa 200 µm dicken „Fäden“ aus Vaseline bedeckt, so daß vier getrennte Kompartimente entstehen (A, B, C, E). Die folgende Abbildung zeigt den experimentellen Aufbau von Almers et al. (1981).



**Abbildung 5:** Schematischer Aufbau der *Vaseline-Gap* Methode. Die Faser wird mit Vaseline Streifen bedeckt, somit wird die Meßkammer in vier Kompartimente (A, B, C, und E) geteilt (nach Almers und Pallade, 1981).

Durch diese Anordnung wird der Abschnitt A elektrisch von den anderen Kompartimenten isoliert. In diesem Kompartiment A befindet sich die Badlösung, in den Kompartimenten C und E befindet sich die intrazelluläre Lösung, die an den offenen Enden in die Faser eindiffundieren kann. Das Potential über der Zellmembran wird über das offene Faserende in Kompartiment C gemessen, das über eine elektronische Rückkopplung auf gleichem Potential wie Kompartiment B gehalten wird. Somit werden Störungen aufgrund von Strömen aus Kompartiment A in Kompartiment C minimiert. Die Spannungsklemme (*Voltage-Clamp*) von Kompartiment A erfolgt durch entsprechende Strominjektion in Kompartiment E.

Weitere Details finden sich in der Arbeit von Hille und Campbell (1976), eine Übersicht über die verschiedenen Modifikationen der Methode findet sich in Kirsch (1997).



## **B. Physiologie des Skelettmuskels**

Now, in order to demonstrate the fineness or slenderness of the Parts of the Flesh, I lenth-ways, of so great a Creature as the Whale is (for this was above 50 Foot long) I placed one of the Hairs of my Beard by one of the Flesh Particels of the Whale, and I judg'd that the said Hair was nine times thicker than one of those which I may call a little Flesh Muscle, it being again composed of other long Particles or Fibres.

*Anthony van Leeuwenhoek, 1712*

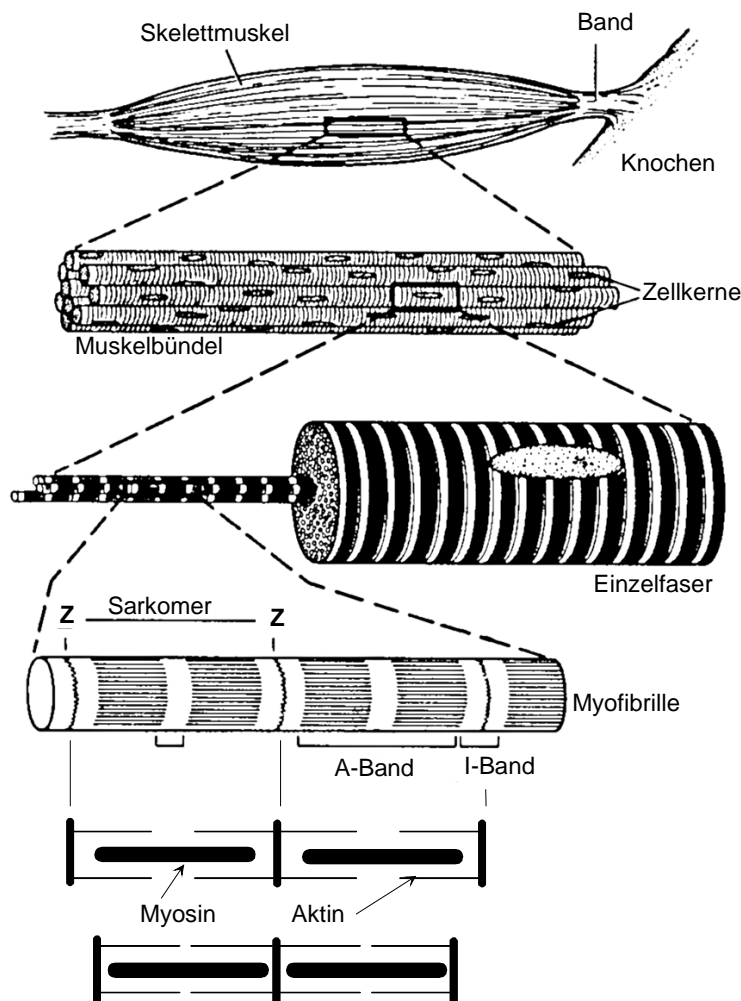
Physiologisch gesehen ist der Muskel ein Kraft-generierendes Organ, dessen Zellen sich verkürzen können. Eine koordinierte Kontraktion wird durch strukturelle Spezialisierungen sowohl des Nervensystems und des gesamten Muskels als auch jeder einzelnen Muskelfaser gewährleistet. Die unterschiedlichen Muskeln weisen eine große Diversität in ihrer Ultrastruktur auf, die sich in einer großen Diversität der mechanischen Eigenschaften von unterschiedlichen Muskeln bemerkbar macht (B.R. Eisenberg, 1983). Sehr wahrscheinlich optimiert eine solche Diversität die Anforderungen an die Beweglichkeit.

Die geschichtliche Entwicklung der Muskelforschung wird sehr schön in dem lesenswerten Buch „*Machina Carnis. The Biochemistry of Muscular Contraction in its Historical Development*.“ von D.S. Needham (1971) beschrieben, wo die frühesten Veröffentlichungen zusammen getragen sind. Weitere historische Darstellungen wurden von A.F. Huxley (1977) über das kontraktile System und von Anderson-Cedergren (1959) und Bennet und Porter (1953) über die Struktur des Muskels veröffentlicht. In dem 1981 erschienenen Buch „*The Structural Basis of Muscular Contraction*“ von J. Squire wird eine komplette Übersicht über die strukturelle Basis der Muskelkontraktion dargestellt.

## 1. Aufbau des Skelettmuskels

Der bis zu einigen Zentimetern dicke Skelettmuskel besteht aus vielen dünnen Muskelfasern mit einem Durchmesser von ca. 50 bis 100  $\mu\text{m}$ . Die Muskelfasern sind durch ihre Innervierung in funktionellen Gruppen (motorische Systeme, bzw. *motor units*) zusammengefaßt. Dabei kann ein einziges Neuron mehrere hundert Fasern kontrollieren. Die Eigenschaften solcher motorischer Systeme wurden in einem Übersichtsartikel von Buchthal und Schmalbruch (1980) zusammengefaßt.

Jede dieser Muskelfasern setzt sich ihrerseits wieder aus einigen hundert Myofibrillen mit ca. 1  $\mu\text{m}$  Dicke zusammen. Eine Myofibrille ist wiederum durch Trennwände (*Z-Scheiben*) in zahlreiche, ca. 2.5  $\mu\text{m}$  lange Sarkomere eingeteilt. Huxley und Hanson erkannten 1954, daß die Querstreifung der Skelettmuskulatur durch eine besonders regelmäßige Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente entsteht (Huxley und Hanson, 1954). Dabei erscheinen die regelmäßig angeordneten 1.6  $\mu\text{m}$  langen Myosinfilamente im Durchlichtmikroskop dunkel, unter polarisiertem Licht als doppelbrechende anisotrope *A-Banden*. Die dünneren Aktinfilamente (ca. 5 nm dick) sind isotrop, erscheinen dadurch hell und werden *I-Banden* genannt. Sie reichen bis zu den *Z-Scheiben* und sind dort fest verankert. Bei der Kontraktion werden die Aktinfilamente durch den sogenannten Querbrückenzyklus aktiv an den Myosinfilamenten vorbeigezogen ohne sich dabei selbst zu verkürzen.



**Abbildung 6:** Aufbau einer Skelettmuskelfaser.

Die Ultrastruktur einer Muskelfaser lässt sich grob in zwei Bereiche unterteilen:

**Krafterzeugung:**

- Proteine und Strukturen, die direkt an der kontraktile Aktivität beteiligt sind. Dabei sind die kontraktile Bausteine durch die Aktin- und Myosinfilamente gegeben, die in den Sarkomeren als eine elementare kontraktile Einheit zusammengefasst sind.

**Versorgung** (d.h. Kontrolle der Kontraktionsstärke und Energieversorgung):

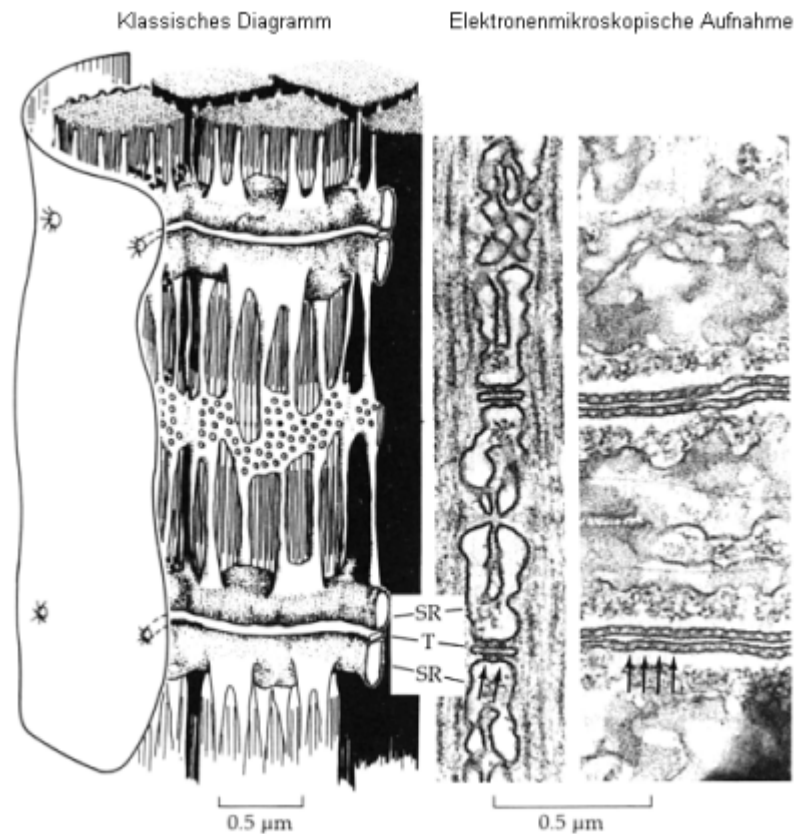
- Die Oberflächenmembran der Faser, das tubuläre System (TTS) und das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) bilden die Kontrolleinheiten.
- Mitochondrien, glycolytische Enzyme und energiereiche Phosphatbindungen (ATP, Creatininphosphat und Argininphosphat) stellen metabolische Energie zur Verfügung. Metabolische Substrate liegen in der Form von Glycogenspeichern und Fettspeichern vor.

## 2. Struktur des transversen tubulären Systems (TTS)

Das TTS einer Muskelzelle besteht aus einem Netzwerk von tubulären Membraneinstülpungen (T-Tubuli) der Plasmamembran der Zelle und bildet eine spezifische funktionelle Verbindung mit dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterschiedlich schnell kontrahierender Muskelfasern wurde klar, daß ein direkter Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit des Kontraktionszyklus und dem Gehalt an SR und TTS besteht (Fahrenbach, 1967; Fawcett et al., 1961; Page 1965, 1968, 1969; Peachey, 1959; Peachey und Porter, 1959; Smith, 1961; Revel, 1962).

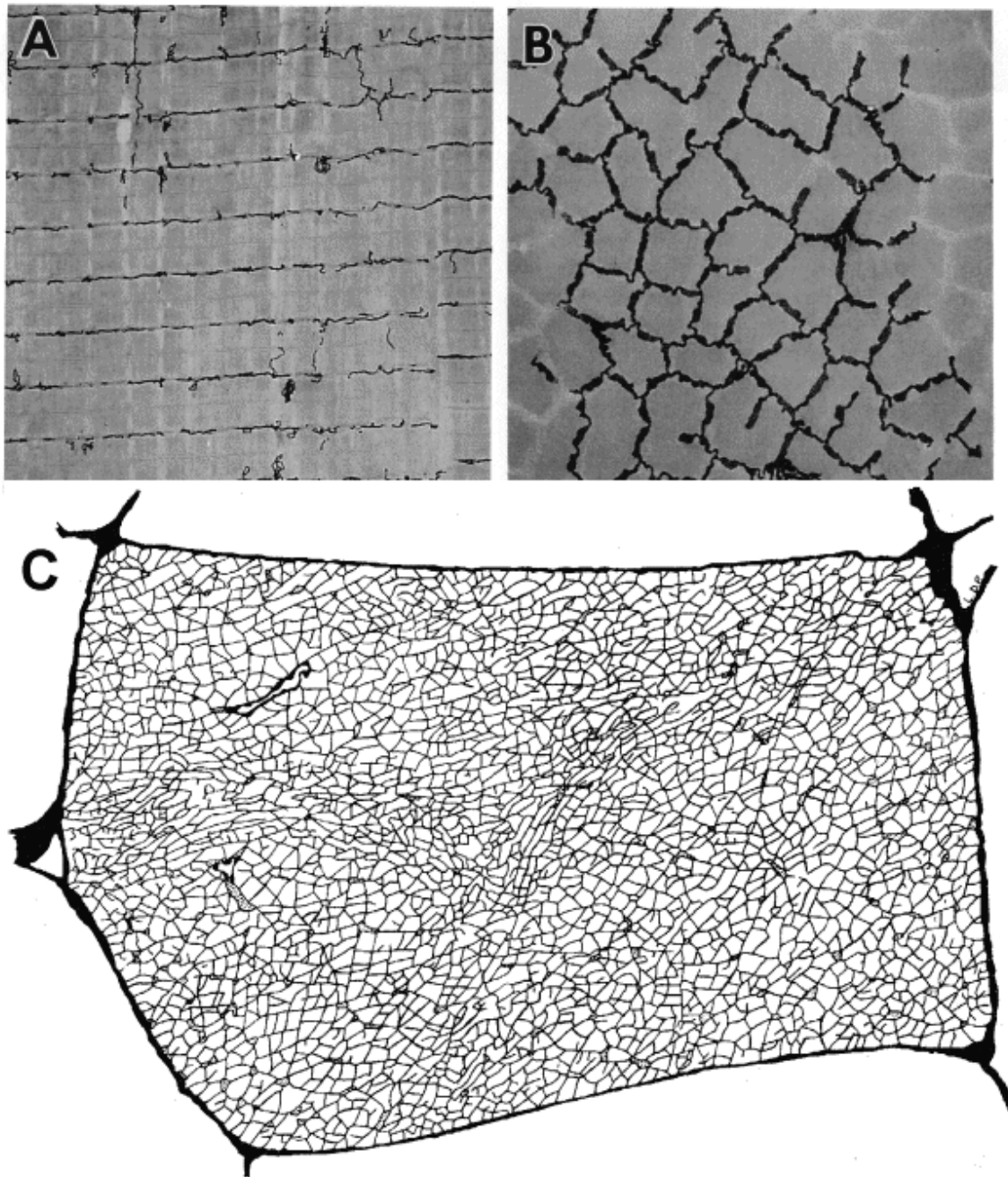
In frühen Untersuchungen der elektrischen Eigenschaften stellten Fatt und Katz (1953) fest, daß die gesamte Zellmembran weitaus größer sein muß, als die reine geometrische Zylinderoberfläche - auch „scheinbare Oberfläche (*apparent area*)“ genannt (Dulhunty und Franzini-Armstrong, 1975) - der Zelle. Die tatsächliche Oberfläche, die aus Faltungen, eingestülpten Caveolen und T-System besteht, ist bei Vertebraten in vielen Zellen um ein Vielfaches größer als die „scheinbare Oberfläche“ (ASM).

Das TTS bildet ein transversal orientiertes Netzwerk, daß über die gesamte Breite der Faser ausgedehnt ist und in Fasern von Amphibien in der Nähe der Z-Scheibe lokalisiert ist.



**Abbildung 7:** Tubuläres Netzwerk des Froschmuskels (Links: Darstellung nach Peachey, 1965; Rechts: Darstellung nach Franzini-Armstrong, 1980)

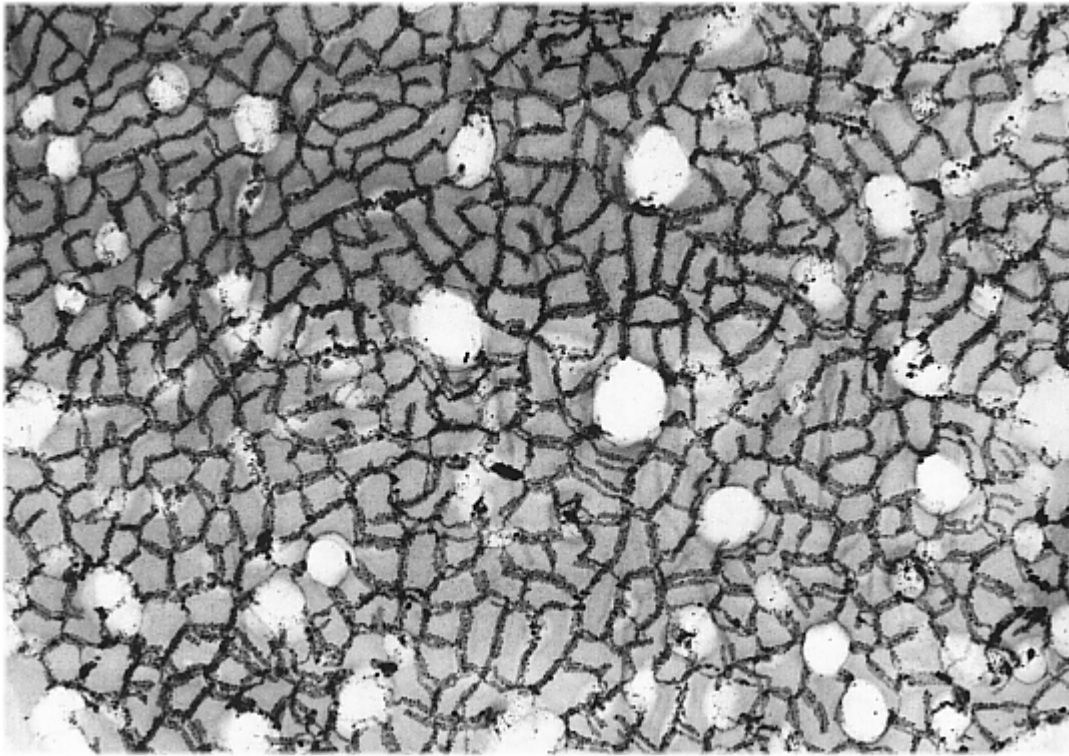
Peachey und Eisenberg (1965) färbten das TTS des Froschmuskels an (Peroxidasefärbung) und rekonstruierten aus mehreren Schnitten die Projektion des Netzwerks auf die Transversalebene. In einer anderen Arbeit (Eisenberg und Peachey, 1975) bestimmten sie die mittlere Länge eines Tubulus zwischen den Kreuzungspunkten zu  $0.9\ \mu\text{m}$  mit einer mittleren Anzahl von 5.4 Knotenpunkten um jede einzelne Myofibrille.



**Abbildung 8:** Schnitt durch eine Einzelfaser des *M. sartorius* (*Rana temporaria*) in Peroxidase-Färbung **A)** Längsschnitt. Vergrößerung 8000fach. **B)** Querschnitt in der Nähe der Z-Scheibe. Vergrößerung 8000fach. (Fujimaki et al., 1993) **C)** Rekonstruktion des TTS einer Froschfaser. Die Tubuli wurden mit der Peroxidase Methode abgefärbt und mit einem Elektronenmikroskop (0.7µm Schickdicke) aufgenommen. 1800-fache Vergrößerung. (Peachey und Eisenberg, 1978).

Die folgende Abbildung zeigt einen 2.5 µm dicken transversalen Schnitt einer roten Muskelfaser des *M. sternomastoid* der Ratte in Golgi Färbung. Hier wird der Hauptunterschied von Säuger zu Amphibie deutlich: es treten zwei T-Systeme pro Sarkomer auf.

Die Abbildungen zur Ultrastruktur des TTS wurden freundlicherweise von Prof. Lee Peachey überlassen.



**Abbildung 9:** Transversaler Schnitt (2.5  $\mu\text{m}$  Dicke) *sternomastoid* Muskels der Ratte in Golgi Färbung. Zwei Lagen des T-Systems liegen innerhalb der Schnittscheibe, woraus ein doppeltes Bild entsteht. 9000-fache Vergrößerung. (Peachey und Franzini-Armstrong, 1978)

In einer Arbeit von Amsellem et al., (1995) wurde eine 3-dimensionale Rekonstruktion des TTS von Säuger-Herzmuskelzellen veröffentlicht. Untersuchungen der TTS-Struktur mit konfokaler Mikroskopie wurden weiterhin von Baumann et al. (1990); Fujimaki et al. (1993) und Murakami et al. (1994) durchgeführt. Aus all diesen Studien wird deutlich, daß sowohl (i) der Volumenanteil des TTS am Gesamtvolumen der Faser als auch (ii) das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen stark vom untersuchten Tier und vom untersuchten Zelltyp abhängt.

Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der für diese Arbeit wichtigen strukturellen Eigenschaften des TTS.

<i>Spezies</i>	<i>Muskel</i>	<i>Typ<sup>(+)</sup></i>	<i>Volumenanteil (%)</i>	<i>Flächendichte (<math>\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3</math>)</i>	<i>Ref.</i>
Maus	Ventrikel	C	0.8	33.3	a)
=	EDL	F	0.4		b)
=	Soleus	SO	0.22		b)
Frosch	Sartorius	FG	0.32	69	c)
Meerschwein	Soleus	SO	0.14	46	d)
=	Weißer Vastus	FG	0.27	54	e)
=	Roter Vastus	FOG	0.28	53	f)
=	SMA <sup>(*)</sup>	SO	0.16	48	g)
Mensch	Quadriceps	F	0.28	33	h)
=	Quadriceps	S	0.13	33	h)

**Tabelle 2:** Prozentualer Anteil des TTS Volumens am Faservolumen und Flächendichte (Verhältnis von der TTS-Oberfläche zum TTS-Volumen).

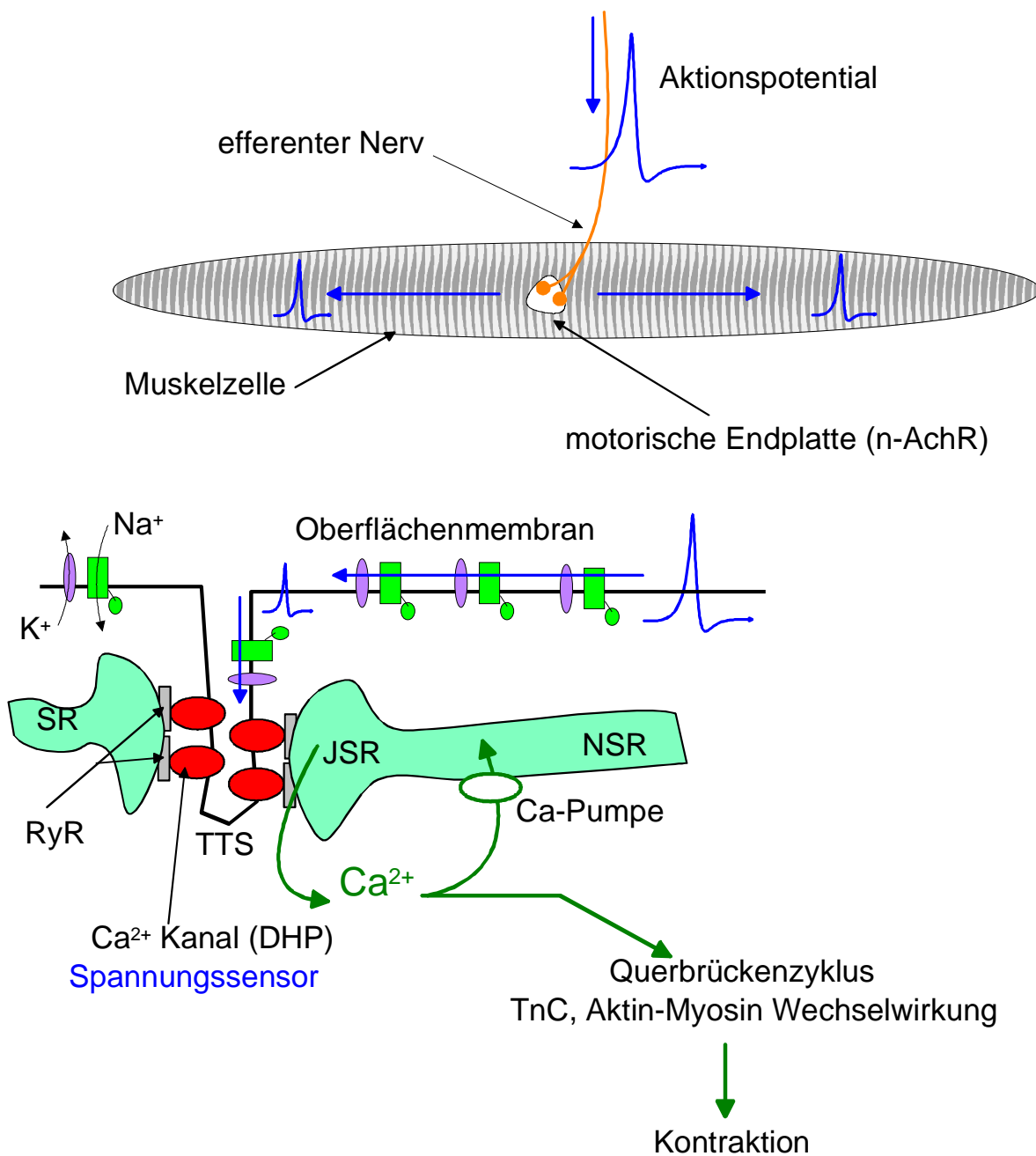
(+) C: Herz, F: schnell, S: Langsam, O: Oxidativ, G: Glycolytisch. (\*) Semimembranosus accessorius  
a) Sommer et al., 1979; b) Luff et al., 1971; c) Mobley et al., 1975; d) Eisenberg et al., 1974; e) Eisenberg et al., 1975; f) Eisenberg et al., 1976; g) Rich et al., 1975; h) Eisenberg, 1983;

Weitere detaillierte Strukturinformationen des TTS werden in einem sehr lesenswerten Übersichtsartikel von Peachey und Franzini-Armstrong (1983) zusammengefaßt.

### 3. Funktion des TTS

Das TTS hat die Funktion, die elektrischen Depolarisationen der Faseroberfläche in das Innere der Zelle weiterzuleiten und durch die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR (Elektromechanische Kopplung, *ec-coupling*) die Kontraktion einzuleiten. Im TTS befinden sich modifizierte L-Type  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (DHP-Rezeptoren), die als Spannungssensor für den Ryanodin-Rezeptor (RyR) dienen. Die Geometrie und die Ausdehnung des TTS sind (neben dem Verhältnis von „schnellem“ zu „langsamen“ Myosin, siehe z.B. Pette, 1980) entscheidende Faktoren für die Kontraktionsgeschwindigkeit einer Muskelfaser (Franzini-Armstrong und Peachey, 1981).





**Abbildung 10:** Reizweiterleitung durch das TTS in das Innere der Muskelfaser

Obwohl bereits sehr viele Details der elektromechanischen Kopplung bekannt sind, ist der genaue Mechanismus und insbesondere die Rolle der langsam aktivierenden L-Type  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme durch den DHP-Rezeptor bis dato noch nicht endgültig aufgeklärt.

### III. Material und Methoden

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Modell zur Untersuchung des Einflusses von Ionenkonzentrationsänderungen auf den zeitlichen Verlauf von Membranströmen wurde sowohl für den Fall einer Verarmung (*depletion*), als auch für den Fall einer Anreicherung (*accumulation*) von Ionen in unmittelbarer Nähe der Zellmembran untersucht. Dazu wurden die Ergebnisse der numerischen Simulation jeweils mit experimentellen Messungen verglichen.

Im ersten Fall (*depletion*) wird idealerweise der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch den L-Type DHP Rezeptor untersucht, da diese Ionenkanäle ausschließlich im TTS lokalisiert sind (Almers, Fink und Pallade, 1981) und eine relativ langsame Inaktivierungskinetik aufweisen. Diese Untersuchungen wurden an einzelnen Skelettmuskelzellen der BALB/c Maus (*M. interosseus* und *M. lumbricalis*) durchgeführt. Aufgrund der Kanaleigenschaften und des Konzentrationsgradienten sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausströme experimentell fast nicht zu beobachten. Bei den gemessenen Auswärtsströmen handelt es sich meist um Kaliumströme, die durch den L-Type DHP  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal fließen (Hille, 1992; Jafri et al., 1998). Somit kommt es bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen nicht zu einer Anreicherung von Ionen im TTS.

Im Fall einer Anreicherung bietet sich aufgrund des Konzentrationsgradienten und der intrinsischen Eigenschaften der  $\text{K}^+$  Kanäle die Untersuchung von  $\text{K}^+$  Strömen an. Idealerweise wird der Kaliumausstrom bei erschöpften Muskelfasern untersucht, da dort keine intrinsische Kanalkinetik vorgefunden wird. Zur Untersuchung der *accumulation* Hypothese wurden daher frühe Messungen von Fink und Wettwer benutzt, die an erschöpften Muskelfasern (*M. sartorius*) des Frosches *rana temporaria* aufgenommen wurden. Bei erschöpften Fasern zeigt die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit keine gleichrichtenden Eigenschaften, wodurch auch für  $\text{K}^+$  im Falle einer Hyperpolarisation eine Konzentrationsverarmung untersucht werden kann. Bei dem untersuchten Kanal handelt es sich um den ATP-abhängigen Kaliumkanal ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) der in der Arbeit von Stanfield und Standen (1983) ausführlich beschrieben wird.

Im folgenden Abschnitt A werden neben den  $\text{Ca}^{2+}$ -Experimenten (Säuger) auch die  $\text{K}^+$  Experimente an erschöpften Fasern (Frosch) vorgestellt.

## **A. Elektrophysiologie**

### **1. Präparation der Einzelfasern**

#### *a) Maus (BALB/c), Mm. interossei, Messung der $Ca^{2+}$ -Ströme*

In den elektrophysiologischen Experimenten wurden Einzelfasern der *Mm. interossei* von 2-3 Monate alten BALB/c Mäusen untersucht. Sämtliche Versuche wurden gemäß den Richtlinien der Tierschutz-Kommission der Universität Heidelberg durchgeführt. Die Tiere wurden vor der Präparation für 10 Minuten einer mit Äther gesättigten Atmosphäre ausgesetzt und eingeschläfert. Danach wurden die *Mm. interossei* unter einem Präparations-Mikroskop (Olympus SZ 40 oder SZ 60) freigelegt. Die isolierten Muskelbündel wurden für 30 Minuten in einer Collagenase-Verdauungslösung (Lösung A, siehe nächster Absatz, Seite 40) (Collagenase Typ IA, Sigma, 1.5 mg/ml) bei 30°C enzymatisch behandelt. Dabei wurde die Petrischale zusammen mit der Lösung (3 ml) in einem temperierten Wasserbad auf konstanter Temperatur gehalten und auf einem Rütteltisch leicht geschüttelt. Somit war eine gleichmäßige Versorgung mit Enzymlösung gewährleistet.

Nach der Behandlung wurden die Faserbündel mit einer Pasteurpipette in ein mit Standard-Ringerlösung (Lösung B; 40 ml) gefülltes Becherglas pipettiert und mit einer weiteren Pipette vorsichtig gespült. Bei einigen Versuchen wurden die verdauten Kollagen-Reste durch vorsichtiges Abzentrifugieren entfernt (Eppendorf Zentrifuge 5417C, 5 Minuten bei max. 40 g). Die Muskeln wurden bei +4°C bis zu 15 Stunden aufbewahrt.

Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die Faserbündel mit einer feuerpolierten Pasteurpipette mehrmals rasch hin und her gespült. Unter leichtem Druck lösten sich von den Faserbündeln einzelne isolierte Einzelfasern. Durch die Enzymbehandlung mit Collagenase war das Bindegewebe zwischen den einzelnen Muskelfasern soweit zerstört, daß sich die Einzelfasern relativ leicht vom Muskelbündel lösten. Die Einzelfasern sammelten sich am Sylgard-beschichteten Boden des Becherglases bzw. der Petrischale. Durch das Präparations-Mikroskop (Olympus SZ40 / SZ 60) wurden die Fasern gesucht und durch Ansaugen mit einer weiteren Pipette in ein separates Becherglas pipettiert. Teilweise wurden die Fasern in ein Eppendorfhütchen pipettiert und der Überstand aus Kollagen-Resten wurde noch einmal abzentrifugiert.

Die einzelnen Muskelfasern wurden mit einer Pipette in die mit Testlösung (Lösung C, D) gefüllte Meßkammer transferiert.

Eine alternative Methode zur Isolation der Einzelfasern bestand darin, die Faserbündel zusammen mit der Verdauungslösung in einem Reagenzglas für 10 Minuten in dem auf 35°C temperierten Rüttelschrank bei ca. 150 U/min zu inkubieren. Danach wurde das Reagenzglas bei Raumtemperatur 5 bis 10 mal für jeweils 10 Sekunden mit 2000 U/min (Cenco Instrumenten B. V., Breda, Niederlande) kräftig geschüttelt. Nach einer Minute hatten sich die Fasern am Boden des Reagenzglases abgesetzt. Die Verdauungslösung wurde danach sorgfältig abpipettiert und es erfolgten 3 Waschgänge. Dabei wurde das Reagenzglas jeweils mit 10 ml Ringerlösung gefüllt und noch einmal bei 60 U/min für 30 Sekunden gerüttelt, nach einer Minute erfolgte ein weiterer Waschgang mit frischer Ringerlösung. Nach dem dritten Durchlauf wurden 8 ml abpipettiert und nach einer weiteren Minute Schüttelns bei 60 U/min wurden die restlichen 2 ml Lösung zusammen mit den Einzelfasern und Faserbündeln in Eppendorfhütchen pipettiert und wie oben beschrieben durch Abzentrifugieren von Kollagen-Resten getrennt. Bei dieser Methode überlebte nur ein geringerer Anteil der Fasern (ca. 10%), allerdings war bei den überlebenden Fasern das Membranpotential stabiler.

### *b) Frosch (Rana temporaria), M. semitendinosus, Messung der $Ca^{2+}$ -Ströme*

Die Messungen an Fasern mit intrazellulär gepuffertem  $Ca^{2+}$  stammen aus der Arbeit von Almers, Fink und Pallade (1981). Die Präparation des *M. semitendinosus* des Frosches *Rana temporaria* wird detailliert von Almers und Pallade (1981) beschrieben, ebenso wie der experimentelle Aufbau der *Vaseline-Gap* Methode (siehe Seite 26 und Hille und Campbell, 1976).

### *c) Frosch (Rana temporaria), M. Sartorius, Messung der $K^+$ -Ströme an metabolisch erschöpften Fasern*

In den Experimenten wurden *sartorius* Muskeln des Frosches *Rana temporaria* benutzt. Die Frösche wurden bei Temperaturen von +4°C bis zu mehreren Wochen in einem dunklen Raum ohne Fütterung aufbewahrt. Nach der Tötung des Tieres durch Dekapitation wurden die präparierten Muskelfasern teilweise für mehrere Stunden bei 3°C gelagert. Die Kontraktion der Muskelfasern wurde durch eine vorherige Erschöpfungsprozedur unterbunden (Fink und Lüttgau, 1976). Dabei wurde der Muskel auf das 1.2 bis 1.3-fache seiner Ursprungslänge gedehnt und durch eine Inkubation in Ringerlösung mit 2 mM Cyanid und 1 mM Iodoacetat (IAA) für 30 Minuten bei 20-23°C oder 1 Stunde bei 1°C vergiftet. (Lösungszusammensetzung siehe nächster Absatz). Danach wurde der Muskel solange mit einer Frequenz von 1 Hz mit externen Elektroden stimuliert, bis unter einem binokularen Mikroskop (40-100 fache Vergrößerung) keine Zuckungen mehr beobachtet wurden.

## 2. Lösungen

### a) Maus, $Ca^{2+}$

Um eine effektive freie  $Ca^{2+}$ -Konzentration von 10 mM für die gepufferte  $Ca^{2+}$ -Lösung zu berechnen wurde das Programm React (Version 2.03, 1991) benutzt, das Prof. Dr. G. L. Smith vom Institute of Biomedical and Life Science, University of Glasgow, U. K. freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat. Die für die Berechnung benötigte Bindungskonstante für den Puffer Maleinsäure stammen aus der Publikation von Martell und Smith (1977). Im Verlauf der Messungen hat sich herausgestellt, daß die berechnete freie  $Ca^{2+}$ -Konzentration der gepufferten Lösung nicht mit der Messung mit einer  $Ca^{2+}$ -sensitiven Elektrode (Orion laboratory Products, Boston) übereinstimmte. Die freie Konzentration wurde daher durch Zugabe von 36 mM zusätzlichem  $Ca^{2+}$ -Acetat auf die gewünschte Endkonzentration von 10 mM freiem  $Ca^{2+}$ -gebracht. Die gepufferte  $Ca^{2+}$ -Lösung hat die gleiche Zusammensetzung wie die ungepufferte  $Ca^{2+}$ -Lösung, nur wurde  $Ca(OH)_2$  anstelle des  $Ca^{2+}$ -Acetats benutzt. Die Konzentration wurde mit Maleinsäure, einem schwachen Puffer, auf ihren Wert gepuffert. Die Konzentrationen sind in mM angegeben.

**Enzymatische Isolationslösung (A):** 140 NaCl; 4 KCl; 2  $CaCl_2$ ; 1  $MgCl_2$ ; 10 HEPES; 1.5mg/ml Collagenase IA (Sigma Chemicals)

**Normale Ringer Lösung (B):** 140 NaCl; 4 KCl; 2  $CaCl_2$ ; 1  $MgCl_2$ ; 10 HEPES; 11 Glucose.

**Ungepufferte  $Ca^{2+}$ -Test Lösung (C):** 10  $Ca^{2+}$ -acetat; 146 TEA-Br; 1  $MgCl_2$ ; 5 Cs-Br; 5 4-Aminopyridine (4-AP); 5 3,4-Di-Aminopyridine (3,4-DAP); 0.1 KCl; 10 HEPES; 60 Tris.

**Gepufferte  $Ca^{2+}$ -Lösung (D):** 65  $Ca(OH)_2$ ; 36  $Ca^{2+}$ -acetat; 3.2  $Mg(OH)_2$ ; 154 TEA-Br; 10 HEPES, 60 Tris; 115 Maleinsäure (Sigma Chemicals); 5 Cs-Br; 5 4-Aminopyridine (4-AP); 5 3,4-Di-Aminopyridine (3,4-DAP); 0.1 KCl;

Der pH wurde mit NaOH oder Ameisensäure auf einen Wert von  $7.40 \pm 0.02$  eingestellt. Spannungsabhängige  $Na^+$  Kanäle wurden mit 500nM tetrodotoxin (TTX, Sigma-Aldrich) geblockt.

Für einige Messungen wurde zu Lösung C und D zusätzlich 300 mM Succrose in die Lösung gegeben, um durch die Hypertonizität die Fasern an der Kontraktion zu hindern.

### b) Frosch, $Ca^{2+}$

Die Messungen von Almers et al. (1981) wurden mit der *Vaseline-Gap* Methode mit einer intrazellulär gepufferten Lösung durchgeführt. Die Intrazellulär-Lösung bestand nur aus einer isotonen Lösung des  $Ca^{2+}$ -Chelators Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether) *N,N*-tetraacetat (EGTA). Die Autoren benutzten (Tetraethylammonium) $_2$  EGTA in 80 mM Konzentration.

**Intrazellulär gepufferte Lösung:** 80 (TEA)<sub>2</sub> EGTA

Die Messungen der Ca<sup>2+</sup>-Ströme wurden ebenfalls in einer 10 mM Ca<sup>2+</sup>-Lösung durchgeführt.

**Ungepufferte extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Lösung:** 10 Ca(CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>-Methansulphonat); 120 TEA-CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>; 3 TEA-Morpholinopropansulphonat

**Gepufferte extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Lösung:** 63 Ca-malat; 49 (TEA)-malat; 10 Ca(CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 120 TEA-CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>

*c) Frosch, K<sup>+</sup>*

Bei den Lösungen handelt es sich um Modifikationen der Standard-Ringerlösung (1). **Standard Ringerlösung (1):** 115 NaCl; 2.5 KCl; 1.8 CaCl<sub>2</sub>; 2.15 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.85 Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**TEA-Testlösung (2):** 115 TEACl; 2.5 KCl; 1.8 CaCl<sub>2</sub>; 3 TrisCl.

Die vergiftende Ringerlösung (siehe auch Seite 39) enthielt 2 mM NatriumCyanid und 1 mM Monoiodoacetat. Sie wurde durch Mischung von 9 Teilen Ringerlösung (1) und einem Teil Stammlösung (Gift) hergestellt. Konzentrationen sind in mM angegeben.

**Stammlösung (Gift):** 20 NaCn; 115 NaCl; 2.5 KCl; 1.8 CaCl<sub>2</sub>; 3 TrisCl.

Zu dieser Mischung wurde eine mit NaOH neutralisierte 40 mM Iodoacetatstammlösung gegeben, um eine Endkonzentration von 1 mM IAA zu erhalten. Die chlorid-freie hochkonzentrierte Kaliumlösung (3) wurde gemäß Hodgkin und Horowicz (1959) hergestellt.

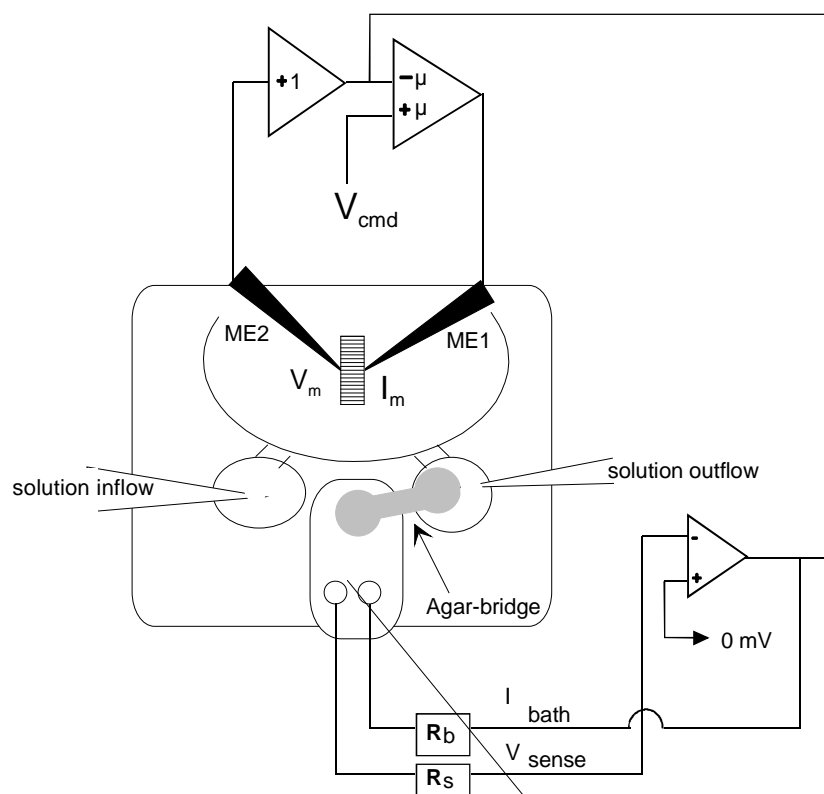
**Hochkonzentrierte Chlorid-freie Kaliumlösung (3):** 40 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 9 CaSO<sub>4</sub>; 1.08 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.43 Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 113 Succrose.

Der pH wurde für alle Lösungen (1) bis (3) mit NaOH bzw. HCl auf einen Wert von 7.2 eingestellt. In den meisten Experimenten wurden die regenerativen Na<sup>+</sup>-Ströme durch 10<sup>-7</sup> M TTX geblockt.

### **3. 2 Mikroelektroden Voltage-Clamp (2-MVC) Strommessungen**

Die Meßkammer bestand aus zwei Kompartimenten (siehe Abbildung 11). Ein Kompartiment enthielt die Meßlösung zusammen mit der zu untersuchenden Faser und den Mikroelektroden, das andere enthielt eine 3 molare KCl -Lösung die mit dem Bad-Vorverstärker (VG-2A-x100, Axon Instruments) auf *virtual ground* (virtuelle Nullspannung) geklemmt war. Die zwei Kompartimente waren elektrisch durch eine mit Meßlösung gefüllte Agar-Brücke miteinander verbunden. Somit wurden die Junction-Potentiale zwischen den Mikropipetten und der Bad-Elektrode minimiert (Finkel und Gage, 1985). Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Meßkammer zusammen mit dem elektronischen Schaltdiagramm. Direkt an die Meßkammer waren zwei kleine Reservoirs angebracht, mit deren Hilfe der Lösungs-

wechsel vereinfacht wurde. Gleichzeitig wurden somit mechanische Reizungen aufgrund von Turbulenzen beim Lösungswechsel weitgehend vermieden. Das Volumen der Meßkammer betrug 0.8 ml und konnte innerhalb von 10 Sekunden komplett ausgetauscht werden. Beim Lösungswechsel von der ungepufferten Lösung (C) auf die gepufferte Lösung (D) wurde das Kammervolumen mit ca. 5 ml bis 10 ml der neuen Lösung durchgespült, um einen kompletten Lösungswechsel sicherzustellen. Weitere Details zur Meßkammer und zur Faserpräparation finden sich in der Literatur (Friedrich et al., 1999), (Friedrich, 2000) und (Ehmer et al., 2000). Die Datenerfassung wird in Abschnitt D (ab Seite 78) behandelt.



**Abbildung 11:** Meßkammer für die 2-MVC 2-Mikroelektroden *Voltage-Clamp*. (nach Friedrich et al., 1999). Schematisches Diagramm der Meßkammer und des Schaltkreises für die 2-MVC mit einer zusätzlichen Bad-Klemme. Die Faser wird in der Mitte senkrecht zu den Pipetten ausgerichtet. Somit können die Pipetten senkrecht zur Faserachse eingestochen werden. ME1: Stromapplizierende Mikroelektrode.  $V_C$ : Kommandopotential,  $R_B$ : Bad-Widerstand um den Badstrom  $I_{bath}$  zu kompensieren;  $R_S$  Spannungsmessende Badelektrode um die Badlösung auf die Spannung  $V_{sense}$  zu klemmen.

Die 2-MVC Messungen wurden mit einem kommerziell erhältlichen Verstärker (Gene-Clamp 500, Axon Instruments) durchgeführt, der über ein DMA Interface (TI-1-125, Axon Instruments) an einen Standardrechner mit Intel 486DX Prozessor angeschlossen war. Die Mikroelektroden wurden unter visueller Kontrolle mit Hilfe von Mikromanipulatoren in der Fasermitte senkrecht zur Längsachse der Einzelfaser von rechts und links eingestochen (siehe Abbildung 12). Auf diese Weise konnte die Faser während der Strommessung frei kontrahieren.

ren, ohne daß die Kontraktion künstlich unterdrückt werden mußte. Kontraktionsbedingte Schäden an der Fasermembran und somit auch das Auftreten von unspezifischen Leckströmen wurden durch den Einstich in der Fasermitte minimiert.

Die Gleichgewichtspotentiale der Einzelfasern lagen zwischen  $-30$  mV und  $-75$  mV. Für die Messungen wurden nur Fasern mit Potentialen negativer als  $-40$  mV benutzt.

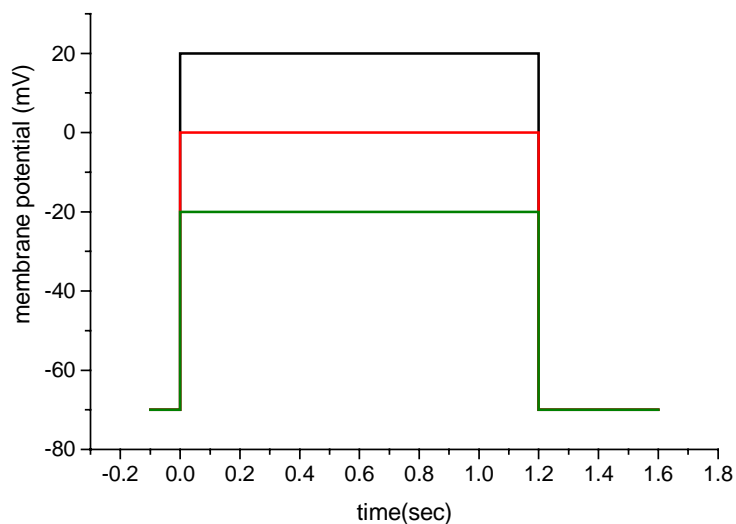


**Abbildung 12:** Zwei Mikroelektroden nähern sich einer Einzelfaser senkrecht zur Faserlängsachse (Cover Illustration des J. Physiol. 517.3, aus Friedrich, Ehmer und Fink, 1999).

Die verwendeten Elektroden wurden mit einem kommerziellen horizontalen Puller (P87, Sutter Instruments) aus Brosilikat-Glasröhrchen (GB 150F-8P, Science Products) gezogen. Die gezogenen Pipetten hatten am spitzen Ende einen Durchmesser von ca.  $0.5\text{ }\mu\text{m}$ . Sie wurden mit  $3\text{ M KCL}$  gefüllt und hatten einen Widerstand zwischen  $6\text{ M}\Omega$  und  $15\text{ M}\Omega$ . Die Elektroden des Vorverstärkers wurden in die mit KCL gefüllten Pipetten eingetaucht und über einen Vorverstärker (HS 2A Headstage, Axon Instruments) an den Verstärker (Gene-Clamp 500) angeschlossen.



Die Datenaufnahme und Vorverarbeitung wurde mit der pCLAMP6 Software (Axon Instruments) durchgeführt. Zu Beginn einer Messung wurde das Potential der Fasern auf ein Haltepotential von  $V_h = -70$  mV geklemmt, danach wurde das folgende Spannungsprotokoll appliziert (siehe Abbildung 13). Die Depolarisationsdauer betrug zwischen 1200 msec bei den ersten Kontrollversuchen und 600 msec bei Messungen in ungepufferter Lösung mit Lösungswechsel zu Messungen in gepufferter Lösung an der selben Faser. Die resultierenden Ionenströme wurden jeweils mit einer Frequenz von 400 Hz aufgenommen.



**Abbildung 13:** Pulsprotokoll zur Messung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen

Die Temperatur bei den Messungen wurde auf Werte von  $T=30^{\circ}\text{C}$ ,  $T=23^{\circ}\text{C}$ ,  $T=20^{\circ}\text{C}$  und  $T=10^{\circ}\text{C}$  reguliert. Die Temperaturkontrolle erfolgte mit einem direkt unterhalb der Meßkammerhalterung angebrachten Peltierelement.

Die Messungen mit Lösungswechsel an der gleichen Faser wurden mit einem reduzierten Pulsprotokoll durchgeführt. Dabei wurde bei  $T=30^{\circ}\text{C}$  mit den Spannungen  $-20\text{ mV}$ ,  $0\text{ mV}$  und  $+20\text{ mV}$  (isotone Lösung) oder bei  $T=23^{\circ}\text{C}$  mit Spannungen von  $-10\text{ mV}$ ,  $0\text{ mV}$  und  $+10\text{ mV}$  (hypertone Lösung) gemessen. Die Fasern wurden zuerst in ungepufferter Lösung gemessen. Nach dem letzten Spannungspuls wurde der Lösungswechsel vollzogen. Dabei wurde das gesamte Kammervolumen mit etwa der 10fachen Menge an ungepufferter Lösung rasch durchgespült. Um eine komplette Eindiffusion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffers (Maleinsäure) in das gesamte Schlauchsystem des TTS zu gewährleisten wurden die Messungen im Regelfall erst 20 Minuten nach dem Lösungswechsel durchgeführt. Der Stromverlauf während des Lösungswechsels wurde auch in drei Fällen bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen um eine Kontrolle über die Güte des Lösungswechsels im Extrazellulär-Medium im Zentrum der Faser zu haben. Die zeitliche Entwicklung ist im Ergebniskapitel auf Seite 119 gezeigt.

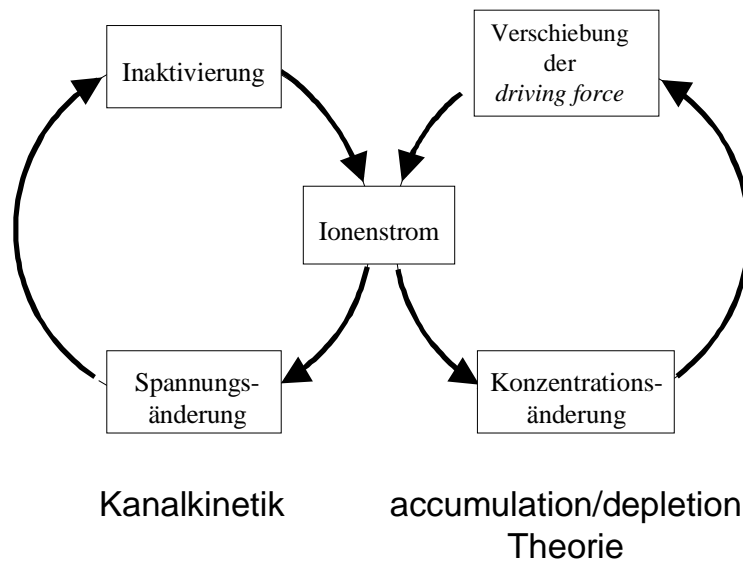
## **B. Mathematische Modellierung**

Ein Modell welches die Natur abbildet  
sollte so einfach wie möglich sein ...  
... Aber nicht Einfacher.

*Albert Einstein*

Im folgenden Abschnitt wird das mathematische Modell vorgestellt, mit dem die Konzentrationsänderungen im TTS untersucht und numerisch simuliert werden.

Neben der intrinsischen zeitlichen Inaktivierung der Ionenkanäle spielt im Skelettmuskel sicher auch die Verarmung von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -bei Depolarisation im transversen tubulären System (TTS) eine entscheidende Rolle. Bei dieser sogenannten *Depletion*-Theorie führt die stetige Änderung der Ionenkonzentration zu einer permanenten Verschiebung der Nernst-Potentiale und somit zu einer veränderten elektro-motorischen Kraft (*driving force*). Diese Veränderung beeinflusst direkt den Stromfluß. Deshalb sollte der Einfluß der Konzentrationsänderungen auf die zeitliche Entwicklung des Stromverlaufs (im Weiteren *Depletion*-Effekt) bei der Analyse von Ionenströmen der intakten Faser mit einbezogen werden. In einer Erweiterung wird auch die Änderung der intrazellulären Konzentrationsänderung berücksichtigt. Dabei wird zwischen  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ - Strömen unterschieden.



**Abbildung 14:** Modell doppelter Stromzirkel (Ehmer, 1997)

Zu Beginn wird ein mathematisches Modell zur Beschreibung des Skelettmuskels vorgestellt. Hierbei wird der Schwerpunkt auf dem Scheibenmodell des TTS (*Disk-Model*) liegen (siehe Seite 53), da mit dessen Hilfe die Konzentrationsänderungen auf einfache und elegante Weise betrachtet werden können. Die Gleichungen der *Depletion*-Theorie werden weiter unten in diesem Abschnitt beschrieben.

Eine von mir im Rahmen dieser Arbeit entwickelte erste Erweiterung des Scheiben-Modells bestand darin, den experimentell aufgenommenen Strom in gepufferter  $\text{Ca}^{2+}$  Lösung  $I_{\text{exp}}^{\text{buf}}(t)$  als Eingabedaten für die numerische Simulation zu benutzen (siehe ab Seite 57). Somit kann der Depletion-Effekt zum ersten mal quantitativ an intakten Zellen untersucht werden.

In der folgenden Tabelle sind die für die mathematische Modellierung benutzten Variablen zusammengestellt (siehe auch Tabelle 1 auf Seite 17 im Kapitel GRUNDLAGEN).

<i>Variable</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Dimension</i>
$R$	Gaskonstante	$J K^{-1} mol^{-1}$
$T$	Temperatur	$^{\circ}K$
$F$	Faradaykonstante	$C mol^{-1}$
$a$	Faserradius	$\mu m$
$r$	Radiale Entfernung vom Zentrum der Faser (siehe <b>Abbildung 17</b> )	$\mu m$
$t$	Zeit	$s$
$R_m(t)$	Gesamtwiderstand pro Einheitsoberfläche der Faser	$\Omega cm^2$
$R_{sm}(t)$	Oberflächenmembranwiderstand (ohne TTS)	$\Omega cm^2$
$R_T(t)$	Widerstand des TTS pro Einheitsoberfläche der Faser	$\Omega cm^2$
$f_T$	Bruchteil der Leitfähigkeit der TTS-Membran an der Gesamtleitfähigkeit	--
$R_i$	Intrazellulärer Längenwiderstand der Faser	$\Omega cm$
$r_S$	Elektrischer Eingangswiderstand des TTS	$\Omega cm^2$
$I_{exp}^{buff}(t)$	Experimentell gemessener $Ca^{2+}$ -Strom in gepufferter $Ca^{2+}$ -Lösung	$\mu A cm^{-2}$
$I_{exp}^{unbuff}(t)$	Experimentell gemessener $Ca^{2+}$ -Strom in ungepufferter $Ca^{2+}$ -Lösung	$\mu A cm^{-2}$
$I_{sim}^{unbuff}(t)$	Berechneter $Ca^{2+}$ -Strom in ungepufferter $Ca^{2+}$ -Lösung	$\mu A cm^{-2}$
$I_{TTS}(t)$	(Kalium-) Strom durch die TTS-Membran	$\mu A cm^{-2}$
$I_{SM}(t)$	(Kalium-) Strom durch die Oberflächenmembran (ohne TTS)	$\mu A cm^{-2}$
$[Ca^{2+}]_o, [K^+]_o$	Extrazelluläre $Ca^{2+}$ -bzw. $K^+$ Konzentration	$mM$
$[Ca^{2+}]_i, [K^+]_i$	Intrazelluläre freie $Ca^{2+}$ -bzw. $K^+$ Konzentration	$mM$
$[Ca^{2+}]_{ss}$	Freie $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zwischenraum (RyR / DHP-R)	$mM$
$E_{ion}$	Nernst-Potential der Ions ( $ion = K^+$ oder $Ca^{2+}$ )	$mV$
$V_{clamp}$	Kommandospannung der Voltage -Clamp	$mV$
$\vartheta$	Verhältnis der Leitfähigkeit der TTS-Membran zur „scheinbaren“ Oberflächenmembran (siehe Seite 60 ff)	--

**Tabelle 3:** Zusammenstellung der in der mathematische Modellierung benutzten Variablen.

## 1. Die Muskelzelle als Kabel

Das Modell zur Beschreibung der Muskelfaser als Kabel wird ausführlich in den Arbeiten von Hodgkin und Rushton (1946) vorgestellt. Falk und Fatt (1964) untersuchten als erste den Einfluß des TTS auf die Impedanz und entwickelten Lösungen der Kabelgleichung für ein Kabel mit endlicher Länge. In diesem Abschnitt werden nur die für diese Arbeit wichtigsten Ergebnisse vorgestellt. Der interessierte Leser wird auf die Originalliteratur verwiesen (Hodgkin und Rushton, 1946; Davis und Lorente de Nó, 1947; Taylor, 1963; Adrian *et al.*, 1969a,b, 1970; Cole, 1972; Adrian und Peachey, 1973; Rall, 1977; Mathias *et al.*, 1977; Jack *et al.*, 1975; Lakshminarayanaiah, 1984; Armstrong und Chow, 1987; Kim und Vergara, 1998). Eine sehr übersichtliche Zusammenstellung findet sich in der Arbeit von Adrian (1983) im *Handbook of Physiology* (Adrian *et al.*, 1983).

Die Kabeltheorie sowie Abschätzungen der Güte der Spannungsverteilung bei Voltage-Clamp Experimenten sind in den Grundlagen ab Seite 17 dargestellt.

## 2. Das TTS als Kabelnetzwerk

Impedanzmessungen an Skelettmuskelfasern haben gezeigt, daß ein Großteil der Membrankapazität im Transversen Tubulären System liegt. Die Tubuli des TTS sind zur Oberfläche der Muskelfaser hin offen und formen ein reguläres Netzwerk (siehe auch Seite 31). Da der Muskel eine zylindrische Geometrie besitzt sind die Netzwerke durch eine Zylinderoberfläche begrenzt.

### a) Beschreibung der Netzwerk-Topologie mit Hilfe des tortuosity Faktors $\sigma$

Durch Einführen eines *tortuosity* Faktors  $\sigma$  kann die gesamte Topologie unterschiedlicher Vernetzungen zusammengefaßt werden. Mit diesem Faktor und dem Verhältnis  $\xi$  (Volumen/Oberfläche der *Tubuli*) und  $\rho$  (Anteil des Volumens der *Tubuli* am Gesamtvolumen der Faser) können effektive Leitfähigkeiten und Kapazitäten definiert werden.

Der Wert des *tortuosity factors*  $\sigma$  beträgt für spezielle zweidimensionale Netzwerke (quadratisch, trigona und hexagonal)  $\sigma = 1/2$  und für einige regelmäßige 3-dimensionale Netzwerke  $\sigma = 1/3$  (Adrian *et al.*, 1969a). Barry und Adrian (1973) verwenden in ihren Untersuchungen einen Faktor  $\sigma = 0.375$ .

In einem 3-dimensionalen Netz ist der Strom innerhalb des Netzwerks an jedem beliebigen Punkt gegeben durch (Peachey & Adrian 1973):

$$\bar{G}_L \text{ grad } u \quad (59)$$

und der Strom, der in das Netzwerk herein bzw. herausfließt, ist

$$\bar{G}_L \operatorname{div} \operatorname{grad} u. \quad (60)$$

Hierbei ist  $u$  das Potential des Sarkoplasmas abzüglich des Potentials im tubulären Lumen. Es gilt also:

$$\frac{\bar{G}_L}{\bar{C}_w} \nabla^2 u - \frac{\bar{G}_w}{\bar{C}_w} u = \frac{\partial u}{\partial t} \quad (61)$$

oder

$$\nabla^2 u - v^2 u = \frac{1}{\kappa} \frac{\partial u}{\partial t} \quad (62)$$

wobei  $v = l/\lambda_T = \sqrt{\frac{\bar{G}_w}{\bar{G}_L}}$  und  $\kappa = \frac{\bar{G}_L}{\bar{C}_w}$ .

In Zylinderkoordinaten lautet die Gleichung wie folgt:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial u}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 u}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} - v^2 u = \frac{1}{\kappa} \frac{\partial u}{\partial t}. \quad (63)$$

Für ein zweidimensionales Netz  $(r, \theta)$  mit radialsymmetrischen Randbedingungen (also  $\frac{\partial u}{\partial \theta} = 0$ ) erhält man:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial u}{\partial r} \right) - v^2 u = \frac{1}{\kappa} \frac{\partial u}{\partial t}. \quad (64)$$

Eine analytische Lösung dieser Gleichung gibt Adrian *et al.* (1969a). Sie beschreibt den Spannungsverlauf beim *Voltage-Clamp* mit intrazellulären Elektroden. Die Randbedingungen bei  $r=a$  lauten:

$$\begin{aligned} u_a &= 0 & t < 0 \\ u_a &= V_s & t \geq 0 \end{aligned} \quad (65)$$

Die Lösung der Gleichung ist gegeben durch

$$\frac{u}{V_s} = \frac{I_0(vr)}{I_0(va)} - 2 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\beta_n \exp\left\{ -\left( (va)^2 + \beta_n^2 \right) \left( \kappa t / a^2 \right) \right\} J_1(\beta_n r/a)}{\left( (va)^2 + \beta_n^2 \right) J_1(\beta_n)}, \quad (66)$$

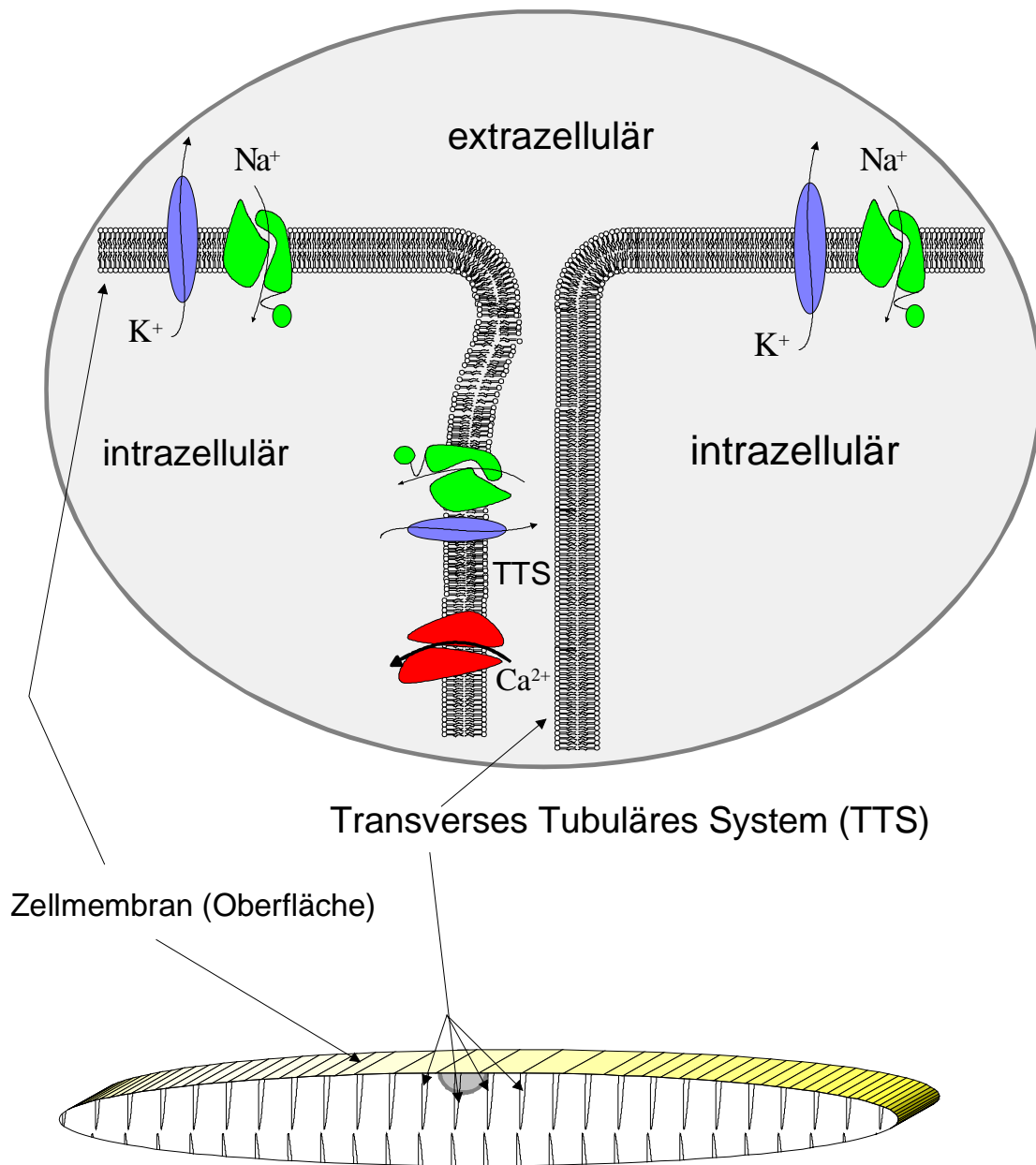
wobei  $I_0(\dots)$  die hyperbolische Besselfunktion nullter Ordnung ist und  $J_0(\dots)$  und  $J_1(\dots)$  Besselfunktionen erster Art sind.  $\beta_1, \beta_2$  bis  $\beta_n$  sind die positiven Lösungen von  $J_0(\beta)=0$ .

### *b) Eingangswiderstand $r_s$*

Durch Impedanzmessungen wurde weiterhin gezeigt, daß das TTS einen Eingangswiderstand besitzt (Peachey und Adrian, 1973) der gemäß Barry und Adrian (1973) durch geometrische Betrachtungen erklärt werden kann. Der Eingangswiderstand berücksichtigt die Verengung des TTS-Schlauches direkt unterhalb der Öffnung zur Faseroberfläche die zu einem reduzierten Diffusionszugang für die Ionen zum TTS führt. Dies resultiert in einer verminderten effektiven radialen Leitfähigkeit.

Eine Verengung der Tubulus-Öffnung an der Faseroberfläche oder eine Verwindung der Tubuli ineinander führt zu einer Vergrößerung des radialen Widerstands in der Nähe der Oberfläche.





**Abbildung 16:** Schematische Zeichnung einer Muskelfaser. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt, daß die L-Type DHP Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (rot) nur im TTS vorhanden sind. Die Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> Kanäle leiten das Aktionspotential in das TTS weiter (siehe auch Seite 35). Die Verengung am Eingang des TTS führt zu einem verminderten Diffusionszugang, der im Ersatzschaltbild durch einen Eingangswiderstand  $r_s$  repräsentiert wird.

Dem wird dadurch Rechnung getragen, daß in der Beschreibung formal ein Eingangswiderstand vorgeschaltet wird. Der Strom durch diesen Widerstand ist

$$i_a = \frac{1}{r_s} (V_s - u_a) = \overline{G}_L \left( \frac{\partial u}{\partial r} \right)_{r=a} . \quad (67)$$

Die Lösung der Gleichung mit der Randbedingung einer sprunghaft angelegten Spannungsstufe  $V_s$  an den Öffnungen des T-Systems lautet:

$$\frac{u}{V_s} = \frac{I_0(vr)}{I_0(va)} - 2 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\beta_n \exp\left\{-\left((va)^2 + \beta_n^2\right)(\kappa t/a^2)\right\}}{\left((va)^2 + \beta_n^2\right)} \frac{J_1(\beta_n r/a)}{J_1(\beta_n)} \quad (68)$$

bzw.

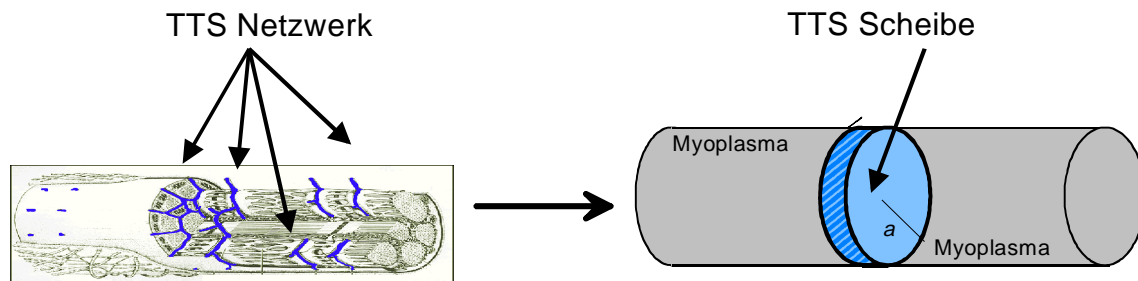
$$V(r,t) = V_a \left\{ 1 - 2 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{v^2 + \alpha_n^2 \exp\left\{-(v^2 + \alpha_n^2)t\right\}}{(v^2 + \alpha_n^2)} \frac{J_1(\alpha_n r)}{\alpha_n J_1(\alpha_n)} \right\} \quad (69)$$

wobei  $h=1/G_L r_s$  und  $\beta_1, \beta_2$  bis  $\beta_n$  die positiven Lösungen von  $\beta J_1(\beta) - ah J_0(\beta) = 0$  sind.

Die Lösungen der zeitabhängigen Gleichungen wurden mit einem *Maple V Rel.3* Programm berechnet. Das Programm ist eine den Gleichungen angepaßte modifizierte Version des Programms zur Berechnung des radialen Konzentrationsprofils für Koffein-Eindiffusion von Dietmar Uttenweiler (1997, Appendix A dort).

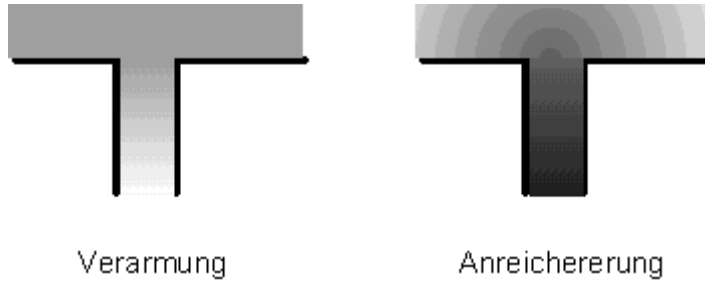
### 3. Das TTS als Scheibe

Das Scheibenmodell wurde zuerst von Adrian, Chandler und Hodgkin im Jahre 1969 vorgestellt. Hierbei wird die Faser als Zylinder beschrieben und das komplette Schlauchnetzwerk des TTS wird in einer einzelnen homogenen Scheibe mit einer äquivalenten effektiven Gesamtleitfähigkeit der TTS-Membran (*wall conductance*  $\bar{G}_w$ ) und einer äquivalenten effektiven radialen Leitfähigkeit des TTS-Lumens  $G_L$  zusammengefaßt. Hierbei wird davon ausgegangen, daß die Röhren des TTS ein regelmäßiges Netz bilden (siehe GRUNDLAGEN) wobei die Dimension der Röhren klein ist im Vergleich zu der Dimension des Netzes, dessen Dimensionen wiederum klein sind im Vergleich zur Ausdehnung der gesamten Muskelfaser.



**Abbildung 17:** Scheibenmodell des TTS. Im vereinfachten Modell mit Zylindergeometrie wird das gesamte TTS in einer homogenen Scheibe mit äquivalenten Leitfähigkeiten repräsentiert. (Abb. Links nach Krstic, 1976).

Die Konzentrationsänderung im TTS ist abhängig vom Strom der aus dem TTS heraus in das Myoplasma fließt und durch die Nachdiffusion von Ionen aus dem als unerschöpflich angenommenen Reservoir außerhalb der Faser. Bei der Untersuchung von Kalium-Strömen bei depolarisierenden Spannungspulsen kehrt sich die Stromrichtung um, es findet also eine Anreicherung im TTS statt und eine Ausdiffusion der Ionen in das Myoplasma.



**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der Konzentrationsverteilung bei Verarmung (links) und Anreicherung (rechts).

Zusammenfassend kann also geschrieben werden (Barry und Adrian, 1973):

$$\frac{\partial c(r,t)}{\partial t} = D_{ion}^{eff} \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial c(r,t)}{\partial r} \right) - \frac{4\pi \cdot a I_{ion}}{\rho \cdot zF}, \quad (70)$$

wobei

$$I_{ion} = -\frac{\bar{G}_w}{4\pi \cdot a} \left( V_o - V(r,t) - \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{c(r,t)}{c_o} \right) \right) \quad (71)$$

den Strom durch die TTS-Wand bezeichnet (siehe auch Glg. (82) , Seite 56). Hierbei ist  $c(r,t)$  die Ionenkonzentration,  $R$ ,  $T$  und  $F$  bezeichnen die Gaskonstante, die Temperatur in °K und die Faradaykonstante,  $z$  ist die Wertigkeit des Ions,  $V_o$  ist das Potential zwischen Sarkoplasma und der extrazellulären Badlösung,  $V(r,t)$  ist das Potential zur Zeit  $t$  im Inneren des TTS im Abstand  $r$  von der Fasermite bezogen auf die Badlösung,  $a$  ist der Faserradius,  $\rho$  bezeichnet den Bruchteil des Faservolumens der vom TTS beansprucht wird.

$$D_{ion}^{eff} = \sigma D_{ion} \quad (72)$$

ist die effektive radiale Diffusionskonstante im TTS. Der freie Diffusionskoeffizient in extrazellulärer Lösung  $D_{ion}$  wird aufgrund der netzartigen Struktur des TTS mit einem Faktor  $\sigma$  multipliziert (siehe weiter oben).

Das elektrische Ersatzschaltbild ist in Abbildung 19 dargestellt. Dabei wurde die TTS-Scheibe in  $m$  konzentrische Ringe unterteilt.

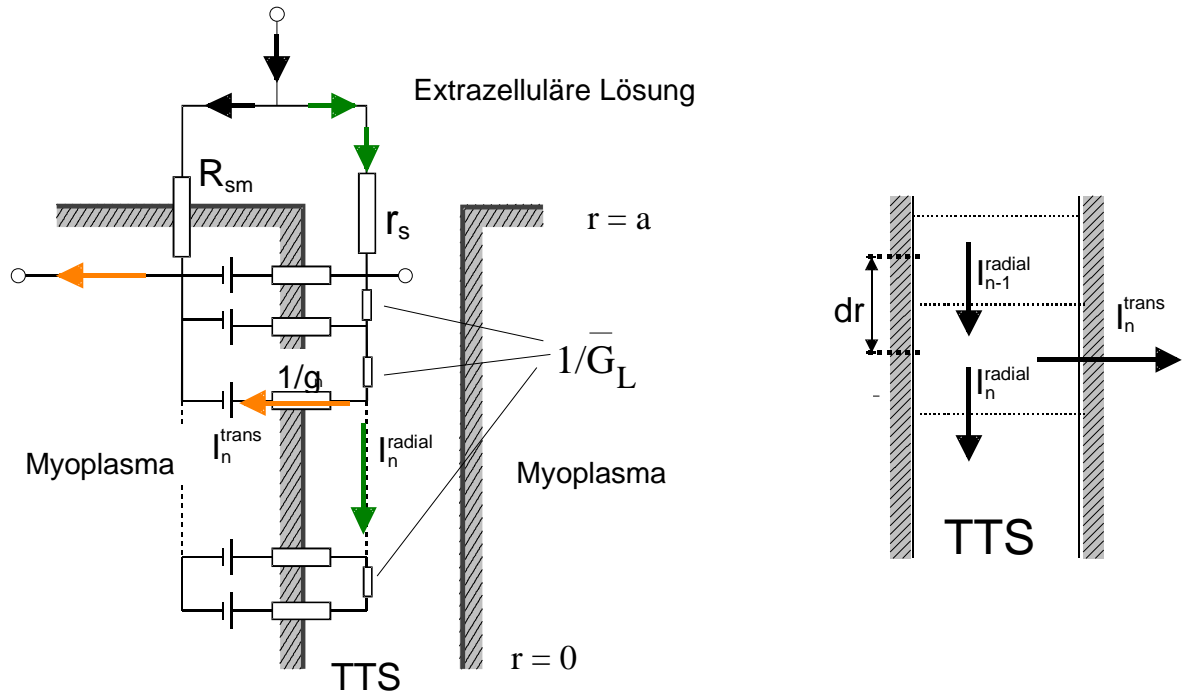


Abbildung 19: Ersatzschaltbild (aus Ehmer et al., 2000).

Für den Strom in den TTS-Scheiben gilt:

$$di(r,t) = 2I_{ion} 2\pi \cdot r dr = \frac{\partial i(r,t)}{\partial r} dr \quad (73)$$

oder

$$I_{ion} = \frac{1}{4\pi \cdot r} \frac{\partial i(r,t)}{\partial r} \quad (74)$$

Ausgehend von obigem Schaltdiagramm für eine TTS-Scheibe wird die Widerstandsänderung  $dR$  von einem Element zum anderen über den Abstand  $dr$  einen Spannungsabfall  $dV$  hervorgerufen:

$$dV = idR = \frac{idr}{2\pi \cdot r \sigma G_L d} = \frac{aidr}{r \sigma G_L} = \frac{aidr}{r \overline{G_L}} \quad (75)$$

wobei  $\overline{G_L}$  definiert wird durch

$$\overline{G_L} = \sigma \rho G_L \quad (76)$$

und somit

$$\frac{\partial V(r,t)}{\partial r} = \frac{a}{r} \frac{i}{G_L}. \quad (77)$$

Für die radiale Spannungsänderung im TTS gilt schließlich folgende Gleichung:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial V}{\partial r} \right) = \frac{4\pi \cdot a}{G_L} I_{ion} \quad (78)$$

Für den stationären Fall ist  $I_{ion}=0$  und es gilt:

$$I_{ion} = 0 = -\bar{G}_w \left( V_{OA} - \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{c_o}{c_{in}} \right) \right) \quad (79)$$

wobei  $V_{OA}$  das Ruhemembranpotential ist. Weiterhin ist  $c_{in}$  die absolute Ionen-Konzentration im Sarkoplasma und  $c_o$  die Ionen-Konzentration im TTS, die im Gleichgewicht gleich der Konzentration der extrazellulären Badlösung entspricht. Werden alle Spannungen als Differenz relativ zum Gleichgewichtspotential angegeben, ist der Strom beim Anlegen eines Spannungspulses gegeben durch (Barry und Adrian 1973):

$$I_{ion} = -\frac{\bar{G}_w}{4\pi \cdot a} \left( V_o - V(r,t) - \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{c(r,t)}{c_o} \right) \right), \quad (80)$$

wobei

$$V_0 = V_{clamp} - \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{c_o}{c_{in}} \right) \quad (81)$$

mit dem Kommandopotential  $V_{clamp}$ .

Mit Vereinfachung des logarithmischen Terms gilt:

$$I_{ion} = -\frac{\bar{G}_w}{4\pi \cdot a} \left( V_{clamp} - V(r,t) - \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{c(r,t)}{c_{in}} \right) \right). \quad (82)$$

Die effektive Leitfähigkeit des TTS  $\bar{G}_w$  kann berechnet werden, falls der Bruchteil  $f_T$  der Ionenleitfähigkeit des TTS im Verhältnis zur Gesamtleitfähigkeit bekannt ist. Es gilt dann:

$$G_T = \frac{f_T}{R_m}, \quad (83).$$

wobei der Membranwiderstand  $R_m$  (in  $\Omega\text{cm}^2$ ) durch die Meßgrößen  $I_{ion}$  (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und die vorgegebene Kommandopotential  $V_{clamp}$  (in mV) sowie dem bekannten Nernst-Potential der Ruhekonzentration  $E_{ion}$  ( $E_{Ca}$  für Calcium bzw.  $E_K$  für Kalium) bestimmt werden kann:

$$R_m = \frac{V_{clamp} - E_{ion}}{I_{ion}}. \quad (84)$$

Die Gleichung zur Bestimmung der TTS-Leitfähigkeit ist gegeben durch:

$$G_T = \frac{\bar{G}_w \lambda_T I_1(a/\lambda_T)}{I_0(a/\lambda_T) + \frac{r_s \bar{G}_L}{\lambda_T} I_1(a/\lambda_T)}, \quad (85)$$

mit

$$\lambda_T = \sqrt{\bar{G}_L / \bar{G}_w} \quad (86)$$

Hierbei sind  $I_0(\dots)$  und  $I_1(\dots)$  die modifizierten Besselfunktionen nullter und erster Ordnung.

#### 4. Erste Erweiterung: Experimentelle Daten als Input am Beispiel der $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme

Eine erste Erweiterung des Scheiben-Modells bestand darin, den experimentell aufgenommenen Strom in gepufferter Lösung  $I_{\text{exp}}^{\text{buf}}(t)$  als Eingabedaten für die numerische Simulation zu benutzen. Die zeitabhängige intrinsische Kanalkinetik wird somit durch die Aufnahme in der gepufferten Lösung direkt berücksichtigt. Die Simulation berechnet den Einfluß, den eine Konzentrationsänderung auf den Strom ausüben würde wenn kein Puffer vorhanden wäre, und gibt die simulierten Daten  $I_{\text{sim}}^{\text{unbuf}}(t)$  in eine Ausgabedatei (siehe ab Seite 78) aus. Die simulierten Daten werden mit den experimentell in ungepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung aufgenommenen Strömen  $I_{\text{exp}}^{\text{unbuf}}(t)$  der gleichen Faser verglichen, wobei im letzteren Fall die Konzentrationsänderung nicht durch einen Puffer künstlich unterbunden wird, sondern wie *in vivo* durch den Einstrom auftreten kann.

Um diesen Vergleich von Simulation  $I_{\text{sim}}^{\text{unbuf}}(t)$  und Messung  $I_{\text{exp}}^{\text{unbuf}}(t)$  zu rechtfertigen werden drei Hauptannahmen gemacht:

(i) In der  $\text{Ca}^{2+}$ -gepufferten Lösung sind Änderungen der Konzentration aufgrund der Puffereigenschaften vollständig unmöglich, d.h. die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der gepufferten Lösung ändert sich nicht. Die unter diesen Bedingungen aufgenommenen Ströme  $I_{\text{exp}}^{\text{buf}}(t)$  beinhalten sowohl die Kanalkinetik der zu untersuchenden L-Type  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle als auch die passiven Kabeleigenschaften der Muskelfaser (wie z.B. die kapazitiven Eigenschaften der Oberflächenmembran und des T-Systems und den Spannungsabfall an den Enden der Faser, siehe GRUNDLAGEN) und unspezifische Leckströme. Die Kinetik der L-Type  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle des Ske-

lettmuskels wird nicht durch die möglichen Konzentrationsänderungen im TTS beeinflusst, d.h. die Kanalkinetik ist im Bereich zwischen  $[Ca^{2+}]_{ext}=10$  mM und  $[Ca^{2+}]_{ext}=0.5$  mM unabhängig von der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration  $[Ca^{2+}]_{ext}$ .

(ii) Die L-Type  $Ca^{2+}$ -Kanäle sind ausschließlich im TTS lokalisiert, woraus folgt, daß die  $Ca^{2+}$ -Ströme größtenteils durch die TTS Membran fließen und nicht durch die Oberflächenmembran der Faser (siehe auch Almers et al., 1981, Ehmer et al., 2000)

(iii) In einem ersten Schritt werden die Änderungen der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration nicht berücksichtigt. Diese Annahme wird in einer zweiten Erweiterung des Modells aufgehoben.

## 5. Zeitabhängigkeit (Kanalkinetik) der Leitfähigkeit

Bei den Kaliumströmen der erschöpften Froschfasern waren experimentell weder Aktivierungs noch Inaktivierungskinetik feststellbar (Fink und Lüttgau, 1973, 1976; Fink 1975). Die folgende Beschreibung der zeitabhängigen Leitfähigkeit gilt daher für die experimentell zeitabhängigen  $Ca^{2+}$ -Ströme der kontrahierenden Maus Skelettmuskelfasern (Friedrich et al. 1999).

Die Zeitabhängigkeit der Leitfähigkeit zur Zeit  $t$  wird durch die folgende Näherungsgleichung beschrieben (Barry und Adrian, 1973):

$$\bar{G}_w(t) = 2 / \left[ a \left( \frac{1}{G_T} - \frac{a}{4 \cdot \bar{G}_L} - r_s \right) \right] \quad (87)$$

wobei  $\bar{G}_L$  die effektive radiale Leitfähigkeit (siehe Adrian et al. 1969a) und  $r_s$  den von Peachey und Adrian (1973) eingeführten Eingangswiderstand darstellt. Die zeitabhängige Gesamtleitfähigkeit des TTS

$$G_T(t) = f_T / R_m(t) \quad (88)$$

wird wie im vorherigen Abschnitt (Glg. 85) berechnet. Dabei ist die explizite Zeitabhängigkeit durch die experimentellen Werte des Membranwiderstands pro Einheitsfläche  $R_m$  (bzw. der Widerstand der Oberflächenmembran parallel zur TTS-Membran) gegeben, und wird nun zeitabhängig durch die folgende Gleichung beschrieben (Adrian et al., 1970):

$$R_m(t) = \frac{V_{clamp} - E_{Ca}}{I_{exp}^{buff}(t)} \quad (89)$$

mit dem experimentell in gepufferter Lösung aufgenommenen Strom  $I_{exp}^{buff}(t)$  und der Kommandopotential  $V_{clamp}$ .  $E_{Ca}$  ist das Nernst-Potential der  $Ca^{2+}$ -Ionen:

$$E_{Ca} = \frac{RT}{2F} \ln \frac{[Ca^{2+}]_{ext}}{[Ca^{2+}]_{int}} \quad (90)$$

Mit der initialen intrazellulären  $Ca^{2+}$ -konzentration  $[Ca^{2+}]_{int}=100$  nM, und einer initialen extrazellulären Konzentration  $[Ca^{2+}]_{ext}=10$  mM resultiert bei einer Temperatur von  $T=23^\circ C$  ein Wert von  $E_{Ca}=+144$  mV.

Durch das Einlesen des jeweils aktuellen Stroms zur Zeit  $t$  wurde mit Hilfe der Gleichung (85) für jeden Zeitpunkt der Simulation eine korrekte Leitfähigkeit ermittelt.

## 6. Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit

Um den Zeitverlauf der gemessenen Ströme korrekt vorhersagen zu können, muß bei der Berechnung der Leitfähigkeit auch die explizite Spannungsabhängigkeit  $\hat{g}(V)$  berücksichtigt werden.

### a) $Ca^{2+}$

Die Spannungsabhängigkeit des L-Type  $Ca^{2+}$ -Kanals im Skelettmuskel wird von Dietze *et al.* durch folgende Gleichung beschrieben:

$$I(V) = \hat{g}_{Ca}(V) \cdot g_{max} \cdot (V - V_{Ca}) + const. \quad (91)$$

Die Konstante in der obigen Gleichung berücksichtigt passive lineare Leckströme und wird nicht weiter berücksichtigt.

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -Leitfähigkeit  $\hat{g}$  wird durch eine Boltzmannfunktion beschrieben, die Parameter sind die Spannung der halb-maximalen Aktivierung  $V_{0.5}$  und die Steigungskonstante  $k$ :

$$\hat{g}_{Ca}(V) = 1/\{1 + \exp((V_{0.5} - V)/k)\} \quad (92)$$

Bei der Berechnung der Leitfähigkeit des TTS  $\bar{G}_w(t, V)$  wurde die Spannungsabhängigkeit für jeden Ring separat berechnet. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß eine analytische Lösung des Problems der Konzentrationsänderungen aufgrund der Nichtlinearität der Spannungsabhängigkeit nicht möglich ist.

### b) $K^+$

Der Gesamtstrom  $I_{tot}$  der erschöpften Fasern weist einer sigmoide Strom-Spannungs Kennlinie auf (siehe z.B. Ehmer 1997), die mit der Boltzmannfunktion beschrieben werden kann:



$$I_{tot} = \frac{A_2 + (A_1 - A_2)}{1 + \exp\{(x - x_0)/dx\}}, \quad (93)$$

wobei  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $x_0$  und  $dx$  Parameter der Boltzmannfunktion sind und  $x(t)$  die treibende Kraft („driving force“) bei einer gegebenen extrazellulären Kaliumkonzentration  $c_{out}$  und einer gegebenen intrazellulären Kaliumkonzentration  $c_{in}$  zum Zeitpunkt  $t$  bezeichnet:

$$x(t) = V_{clamp} - \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{c_{out}(t)}{c_{in}(t)} \right) \quad (94)$$

Die differentielle Steigung der Strom-Spannungs Kennlinie und somit die Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit wurde daher mit der Ableitung einer Boltzmannfunktion gefittet.

$$\hat{g}_K(V) = (A_2 - A_1) \cdot \exp(\dots) / \{1 + \exp(\dots)\}^2 \cdot dx \quad (95)$$

mit  $\exp(\dots) = \exp(-(x - x_0)/dx)$ .

## 7. Verteilung der Leitfähigkeit in der TTS-Membran und in der „scheinbaren“-Oberflächenmembran (ASM)

### a) $Ca^{2+}$

Bei der Untersuchung der  $Ca^{2+}$ -Ströme wurde angenommen, daß die gesamte Leitfähigkeit in der TTS-Membran lokalisiert ist. Eine gesonderte Untersuchung Verteilung der Leitfähigkeit in der TTS-Membran und in der „scheinbaren“-Oberflächenmembran (ASM) war daher nicht nötig.

### b) $K^+$

Die Verteilung der Kanaldichte der ATP-abhängigen Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ) wurde bisher noch nicht quantitativ untersucht. In den numerischen Simulationen der Kaliumströme der erschöpften Froschfasern wurde eine getrennte Untersuchung der Verteilung der Leitfähigkeiten durchgeführt, wobei ein Verhältnis von TTS-Membran zu „scheinbarer“ Oberflächenmembran von  $f_T = 0.66$  angenommen wurde, d.h.  $A_{TTS} : A_{ASM} = 2 : 1$  (Gage, 1965). Die Modellierung wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

## 8. Modellierung einer inhomogenen $K_{ATP}$ Kanaldichte-Verteilung

Zur Modellierung der Kaliumströme an erschöpften Fasern wurde auch eine Konzentrationsänderung an der ASM-Membran zugelassen. Insgesamt wurde der Gesamtstrom zur Berech-

nung der unterschiedlichen Kanaldichteverteilung der  $K_{ATP}$ -Kanäle auf zwei unterschiedliche Arten aufgeteilt.

Dabei wurde der Gesamtstrom  $I_{tot}$  mit Hilfe einer aus einem Fit der Strom-Spannungskennlinie ermittelten Boltzmannfunktion berechnet:

$$I_{tot} = \frac{A2 + (A1 - A2)}{1 + \exp\{(x - x0)/dx\}}, \quad (96)$$

wobei  $x(t)$  die aktuelle treibende Kraft bei gegebener extrazellulärer  $K^+$ -Konzentration  $c_{out}$  und intrazellulärer  $K^+$ -Konzentration  $c_{in}$  zum Zeitpunkt  $t$  bezeichnet:

$$x(t) = V_{clamp} - \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{c_{out}(t)}{c_{in}(t)} \right). \quad (97)$$

Danach wurde die jeweilige Leitfähigkeit für die TTS-Membran und für die ASM-Membran ermittelt, in dem die Gesamtleitfähigkeit mit den unterschiedlichen Flächenanteilen  $f_T$  gewichtet wurde:

$$\begin{aligned} g_{ASM} &= (1 - f_T) \frac{I_{tot}}{x} \\ g_{TTS} &= f_T \frac{I_{tot}}{x} \end{aligned} \quad (98)$$

Aus diesen Leitfähigkeiten wurde wieder wie in Gleichung (87) beschrieben eine effektive Leitfähigkeit ermittelt.

Zur Untersuchung der Kanaldichteverteilung wurde ein Gewichtungsfaktor  $\vartheta$  eingeführt, der unter Beibehaltung einer konstanten Gesamtleitfähigkeit variiert wurde:

$$\begin{aligned} g_{SM} &= (1 - \vartheta \cdot f_T) \frac{I_{tot}}{x} \\ g_{TTS} &= \vartheta \cdot f_T \frac{I_{tot}}{x} \end{aligned} \quad (99)$$

## 9. Zweite Erweiterung: Änderung der intrazellulären Konzentration

In einer zweiten Erweiterung des Scheibenmodells wird nun auch die Änderung der intrazellulären Konzentration berücksichtigt. Hierbei wurde zwischen Kaliumströmen der erschöpften Froschfasern und Calciumströmen der Mausfasern unterschieden.

### a) $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme, komplette Beschreibung

Die Situation für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme ist wesentlich komplexer als die Situation zur Beschreibung der  $\text{K}^+$ -Ströme. Hier kommt zusätzlich zur durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom  $I_{\text{Ca}}$  getragenen Änderung auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Myoplasma hinzu. Dabei wird in mehreren in der Literatur beschriebenen Modellen (siehe z.B. Jafri et al., 1998) berücksichtigt, daß das SR in zwei Kompartimente aufgeteilt werden muß: ein Kompartiment, aus dem die Freisetzung erfolgt (junctional SR, JSR) und ein Kompartiment in dem der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher sitzt, (network SR, NSR). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Uttenweiler et al. (1998), die eine Koffein-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR an permeabilisierten Fasern betrachtet hatten, wird im Weiteren auf die Modelle des zweigeteilten SR und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (CICR,  $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release) durch den Ryanodinrezeptor (RyR) von Jafri et al. (1998) zurückgegriffen.

In vielen für Kardiomyozyten aufgestellten Modellen fließt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch den DHP-Kanal ebenso wie das vom SR freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -direkt in das Myoplasma (DiFrancesco und Noble, 1985; Luo und Rudy, 1994a,b). Andererseits existieren auch viele Modelle (für Kardiomyozyten) in denen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß in ein Unterkompartiment („Subspace“) mit wesentlich geringerem Volumen fließt, wo die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf wesentlich höhere Werte ansteigen kann, wie dies im Fall eines einzigen Kompartiments der Fall ist (Isenberg, 1995; Nordin, 1993; Ster, 1992; Lederer et al., 1999). Der Ausgleich der Konzentrationen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ss}}$  im Zwischenraum mit der Myoplasmakonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  geschieht durch den Fluß  $J_{\text{xfer}}$  aus dem Unterkompartiment in das Myoplasma mit einer Zeitkonstante von  $\tau_{\text{xfer}}$ .

Weiterhin werden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die intrazellulären Puffer Calmodulin (CMDN), Parvalbumin (im Skelettmuskel), Troponin (Tn) und auch ATP gepuffert.

Für eine sehr schnelle Bindungskinetik der Puffer (schnell im Vergleich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR) bleiben die Konzentration von freiem  $\text{Ca}^{2+}$ -und gebundenem  $\text{Ca}^{2+}$ -sehr nahe am Gleichgewicht. In diesem Fall kann die Näherung von Wagner und Keizer (1994) benutzt werden. Diese Näherung trifft für die Puffer Calmodulin (im SR und Myoplasma) und Calcequestrin (im SR) zu. Für die langsamere Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -an Troponin und Parvalbumin werden die Differentialgleichungen der Reaktionskinetik gelöst (siehe z.B. Baylor et al., 1983; Rios et al., 1999; Nordin, 1993; Luo und Rudy, 1994; Uttenweiler et al., 1998; Jafri et al., 1998).

Insgesamt werden in vielen Modellen im Gegensatz zu dem relativ einfachen Fall der Kaliumströme für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen mehrere Differentialgleichungen untersucht.

Das gesamte  $\text{Ca}^{2+}$ -Untersystem setzt sich zusammen aus den Änderungen von

- 1) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Myoplasma  $[\text{Ca}^{2+}]_i$
- 2) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zwischenraum  $[\text{Ca}^{2+}]_{ss}$
- 3) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im junctional SR  $[\text{Ca}^{2+}]_{JSR}$
- 4) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im network SR  $[\text{Ca}^{2+}]_{NSR}$
- 5) der Offenwahrscheinlichkeit der  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzungskanals RyR
- 6) der an Troponin gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Myoplasma
- 7) der an Parvalbumin gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Myoplasma
- 8) der an ATP gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Myoplasma

Weiterhin werden folgende  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxe betrachtet:

- 1) die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (CICR)  $J_{rel}$  durch den RyR
- 2) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR  $J_{up}$  durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Pumpe
- 3) der Transfer  $J_{tr}$  von  $\text{Ca}^{2+}$ -von NSR in das JSR
- 4) der Flux  $J_{xfer}$  aus dem Zwischenraum in das Myoplasma
- 5) der Flux  $J_{TnC}$  von an TnC bindendem  $\text{Ca}^{2+}$ -
- 6) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom  $I_{Ca}$  durch den DHP Rezeptor
- 7) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß  $I_{p(Ca)}$  durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe vom Sarkoplasma ins Extrazellulärmedium
- 8) der Strom des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers

#### ***b) $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme, vereinfachte Beschreibung***

Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Myoplasma steigt für alle untersuchten Modelle jeweils auf einen maximalen Wert von ca. 1  $\mu\text{M}$  (für Herzmuskelzellen; Jafri et al., 1998) bis 20  $\mu\text{M}$  (für Skelettmuskelzellen, Baylor et al., 1983, Rios et al., 1999), die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zwischenraum steigt auf einen initialen Wert von ca. 23  $\mu\text{M}$ , fällt dann aber innerhalb von ca. 30 msec auf einen Wert von unter 0.5  $\mu\text{M}$  zurück (Jafri et al., 1998).

Zur Berechnung des Einflusses der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung auf den Stromverlauf unter *Voltage-Clamp* Bedingungen wurde nur der Beitrag des zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms (getragen durch  $I_{Ca}$ ) in das Myoplasma berücksichtigt. Diese Vereinfachung wird

durch die Tatsache gerechtfertigt, daß bereits bei der Aufnahme der experimentellen Ströme  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$  sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR als auch die Pufferung durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer und die dadurch entstehende Konzentrationsänderung der freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme enthalten ist. Die Rechtfertigung für diese Annahme wird im Kapitel DISKUSSION vertieft (siehe ab Seite 161).

Die in dieser Arbeit relevanten Konzentrationsänderungen können insgesamt durch die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_i}{dt} = I_{\text{sim}}^{\text{unbuff}}(t) \cdot \frac{A_{\text{TTS}}}{2 \cdot F \cdot V_{\text{myo}}} \cdot \prod_j B_j \quad (100)$$

wobei  $I_{\text{sim}}^{\text{unbuff}}(t)$  der  $\text{Ca}^{2+}$ -strom ist,  $A_{\text{TTS}}$  bezeichnet die Fläche der TTS-Membran,  $V_{\text{myo}}$  ist das Myoplasmavolumen,  $F$  die Faradaykonstante. Der Faktor 2 im Nenner ist die Wertigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions, die Faktoren  $B_j$  berücksichtigen die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferung von Calmodulin, Parvalbumin, Troponin und ATP (Wagner und Keizer, 1994). In der vereinfachten Beschreibung wird angenommen, daß auch für die Puffer mit langsamerer Kinetik (Troponin und Parvalbumin) die Näherung von Wagner und Keizer benutzt werden kann. Die einzelnen Faktoren lauten:

$$\begin{aligned} B_{\text{CMDN}} &= \left\{ 1 + \frac{[\text{CMDN}]_{\text{tot}} \cdot K_m^{\text{CMDN}}}{(K_m^{\text{CMDN}} + [\text{Ca}^{2+}]_i)^2} \right\}^{-1} \\ B_{\text{Parv}} &= \left\{ 1 + \frac{[\text{Parv}]_{\text{tot}} \cdot K_m^{\text{Parv}}}{(K_m^{\text{Parv}} + [\text{Ca}^{2+}]_i)^2} \right\}^{-1} \\ B_{\text{Tn}} &= \left\{ 1 + \frac{[\text{Tn}]_{\text{tot}} \cdot K_m^{\text{Tn}}}{(K_m^{\text{Tn}} + [\text{Ca}^{2+}]_i)^2} \right\}^{-1} \\ B_{\text{ATP}} &= \left\{ 1 + \frac{[\text{ATP}]_{\text{tot}} \cdot K_m^{\text{ATP}}}{(K_m^{\text{ATP}} + [\text{Ca}^{2+}]_i)^2} \right\}^{-1} \end{aligned} \quad (101)$$

wobei  $[\text{Puffer}]_{\text{tot}}$  die totale intrazelluläre Pufferkonzentration (CMDN: Calmodulin; Parv: Parvalbumin, TnC: Troponin, ATP: ATP) bezeichnet und  $K_m^{\text{Puffer}}$  die halbmaximale Sättigungskonzentration für den jeweiligen Puffer. Die Werte für  $K_m^{\text{Puffer}}$  wurden mit Hilfe der Gleichung

$$K_m^{\text{Puffer}} = \frac{\text{Puffer : off}}{\text{Puffer : on}} \quad (102)$$

berechnet, wobei *Puffer:on* bzw. *Puffer:off* die Ratenkonstanten des jeweiligen Puffers bezeichnen.

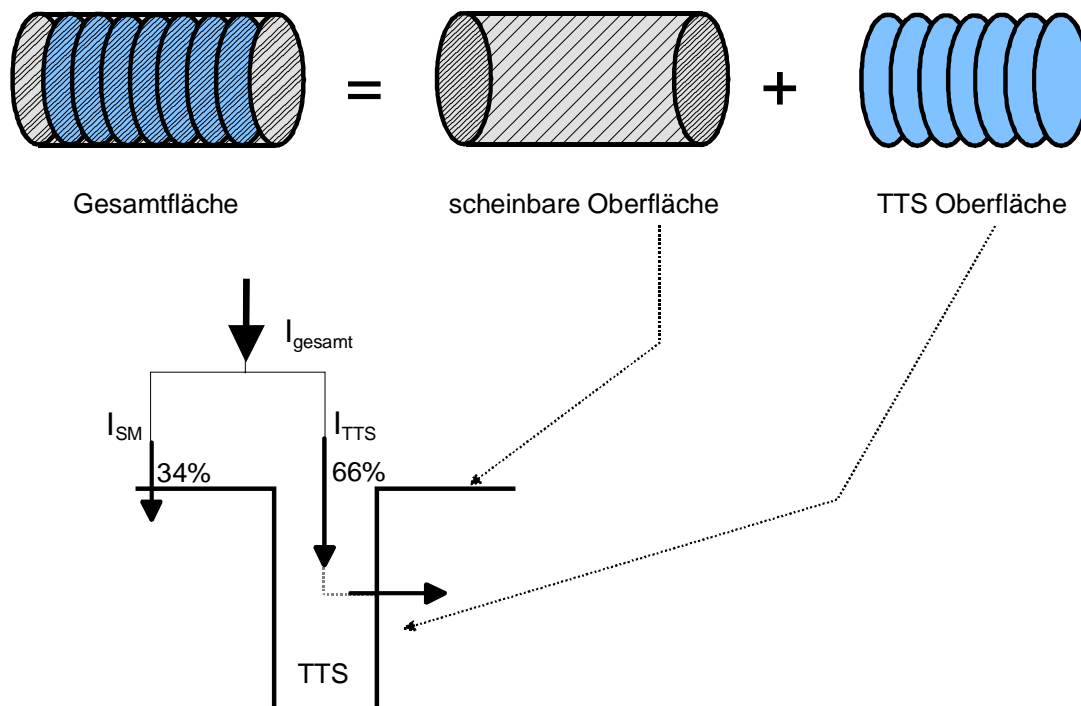
Parameter	Wert	Referenz
$K_m^{CMDN}$	2.38 $\mu\text{M}$	a), b)
Parv:Ca on	$1.25 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	c)
Parv:Ca off	$0.5 \text{ s}^{-1}$	
$K_m^{Parv}$	0.004 $\mu\text{M}$	
Tn:Ca on	$0.575 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	c)
Tn:Ca off		
$K_m^{Tn}$	11.5 $\text{s}^{-1}$	e)
	2.0 $\mu\text{M}$	
Tn:Ca on	$1.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	
Tn:Ca off	$23 \text{ s}^{-1}$	
$K_m^{Tn}$	0.2 $\mu\text{M}$	d)
ATP: on	$1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	
ATP:off	$3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$	
$K_m^{ATP}$	20 mM	
[CMDN] <sub>i</sub>	50 $\mu\text{M}$	b)
[Parv] <sub>i</sub>	1 mM	c)
[Tn] <sub>i</sub>	70 $\mu\text{M}$	b)
	140 $\mu\text{M}$	e)
	240 $\mu\text{M}$	c)
[ATP] <sub>i</sub>	5 mM	f)

**Tabelle 4:** Buffer-Parameter zur intrazellulären Konzentrationsänderung.

Referenzen: a) Jafri et al. (1998); b) Luo und Rudy (1994); c) Baylor et al. (1983); d) Baylor und Hollingworth (1998); e) Robertson et al. (1981); f) Ríos et al. (1999)

c)  $K^+$ -Ströme

Im Fall der Kaliumströme wurde die Änderung der intrazellulären Konzentration direkt proportional der extrazellulären Konzentrationsänderung angenommen. Dabei wird berücksichtigt, daß die Kaliumströme zu  $f_T = 66\%$  durch die TTS Membran fließen (Eisenberg und Gage, 1965) und zu  $1 - f_T = 34\%$  durch die sogenannte „scheinbare“-Membranoberfläche (ASM) („*aparent surface*“ *membrane*).



**Abbildung 20:** Modell zur intrazellulären Kaliumkonzentrationsänderung, hervorgerufen durch den Fluß durch die Oberflächenmembran und den Strom durch die TTS Membran.

Die intrazelluläre Konzentrationsänderung wird durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$\Delta C_{in} = \Delta C_{TTS} + \Delta C_{ASM} \quad (103)$$

Die Konzentrationsänderung im TTS  $\Delta C_{TTS}$  entspricht dem Flux durch die TTS Membran:

$$\Delta C_{TTS} = \frac{I_{TTS}}{F} \cdot \frac{A_{TTS}}{V_{myo}} = 0.66 \cdot \frac{I_{gesamt} \cdot A_{total}}{V_{myo}}, \quad (104)$$

die Konzentrationsänderung  $\Delta C_{ASM}$ , die durch den Strom durch die „Scheinbare Oberflächenmembran“ hervorgerufen wird, ist gegeben durch:

$$\Delta C_{ASM} = \frac{I_{ASM}}{F} \cdot \frac{A_{ASM}}{V_{myo}}. \quad (105)$$

wobei  $A_{ASM}$  bzw.  $A_{TTS}$  die Fläche der „scheinbaren Oberflächen“ bzw. der TTS-Membran bezeichnet und  $V_{myo}$  das intrazelluläre Volumen.



### C. Numerische Simulation

Für die numerische Simulation des Einflusses der Konzentrationsänderungen (*Depletion*-Effekt) auf die zeitliche Entwicklung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme wurde angenommen, daß der experimentell in gepufferter Lösung gemessene  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom  $I_{\text{exp}}^{\text{buf}}(t)$  (ohne *Depletion*-Effekt) als Input für die numerische Simulation benutzt werden kann.

Um einen Vergleich der simulierten Ströme  $I_{\text{sim}}^{\text{unbuf}}(t)$  (mit *Depletion*-Effekt) mit den experimentellen Meßdaten der gleichen Faser in ungepufferter Lösung  $I_{\text{exp}}^{\text{unbuf}}(t)$  zu erlauben, wurden folgende Annahmen getroffen:

#### Grundannahmen für $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme an kontrahierenden Fasern:

1. In der extrazellulär  $\text{Ca}^{2+}$ -gepufferten Lösung ist eine Konzentrationsänderung aufgrund der Puffereigenschaften komplett unterdrückt. Die unter diesen Bedingungen gemessenen Ströme  $I_{\text{exp}}^{\text{buf}}(t)$  beinhalten sowohl die intrinsischen Kanaleigenschaften des L-Type DHP Rezeptors als auch die passiven elektrischen Eigenschaften (Jack et al. 1975) eines sich verkürzenden Kabels (Friedrich, Ehmer, Fink 1999).
2. L-Type  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sind ausschließlich in der TTS Membran lokalisiert, somit fließen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme ausschließlich durch die TTS-Membran und nicht durch die Oberflächenmembran (Almers et al. 1981).
3. Die intrinsischen Eigenschaften des L-Type DHP Rezeptors werden durch eine mögliche Änderung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht beeinflusst.

Für die Untersuchung der Kaliumströme am erschöpften Muskel stehen keine Messungen mit einem Kaliumpuffer zur Verfügung, als Eingabedaten für die Simulation werden ohmsche Stromantworten auf einen Spannungspuls benutzt. Die Leitfähigkeit für Kalium ist nicht auf das TTS beschränkt, somit ändern sich die Annahmen für die Untersuchung der  $\text{K}^+$  Ströme wie folgt:

#### Grundannahmen für $\text{K}^+$ Ströme an erschöpften Fasern:

1. Die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik der erschöpften Fasern ist nicht mehr vorhanden. Der Strom fließt durch die ATP-abhängigen Kaliumkanäle ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) mit einer sehr schnellen Aktivierungs- und einer zu vernachlässigenden Inaktivierungskinetik (siehe z.B. Fink et al., 1982 als Übersicht). Die Leitfähigkeit hat somit quasi nur noch passive ohm-

sche Eigenschaften (Ehmer, Wettwer, Fink, 2000) die nicht durch Kaliumkonzentrationsänderungen beeinflusst wird.

2. Die  $K^+$  Ströme fließen zu 2/3 durch die TTS-Membran und zu 1/3 durch die „Scheinbare“ Oberflächenmembran (ASM) (d. h. die Oberflächenmembran ohne TTS-Membran). Aufgrund von sehr hohen Stromdichten kommt es auch kurzzeitig zu Konzentrationsänderungen (siehe auch Cohen und Kline, 1982).
3. In einer ersten Annahme wird (i) die Kanaldichte der  $K_{ATP}$ -Kanäle in den Flächen der TTS-Membran und in der ASM-Membran als gleich angenommen und (ii) weitere Komponenten vernachlässigt, d.h. es wird angenommen, daß der gesamte Strom durch den  $K(ATP)$ -Kanal geht.
4. In einer weiteren Untersuchung wird (i) eine Variation der TTS-Kanaldichte zugelassen und (ii) eine Korrektur der simulierten  $K_{ATP}$ -Ströme durch zusätzliche Stromkomponenten (z.B. *Delayed Rectifier*) vorgenommen (siehe auch Cannon et al., 1993).

## 1. Algorithmus, Diskretisierung in Ort und Zeit

Die Zeitdauer eines Pulses wurde in diskrete Schritte  $\Delta t$  unterteilt. Zu jedem Zeitpunkt  $t$  wurde in jedem der  $m$  Ringe aus der Konzentration  $c_n(t)$  in Ring  $n$  mit Hilfe der Runge-Kutta-Methode 4. Ordnung (Kinzler 1996) die Konzentrationsänderung und somit die neue Konzentration zum Zeitpunkt  $t + \Delta t$  berechnet. Die Gleichungen hierfür sehen wie folgt aus:

$$\frac{dc_n}{dt} = f(t, c_n) \quad (106)$$

$$c_n(t + \Delta t) = c_n(t) + \frac{(K1_n + 2K2_n + 2K3_n + K4_n)}{6} \quad (107)$$

wobei  $f(t, c_n)$  durch die Differenz aus  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem TTS in die Faser und  $Ca^{2+}$ -Nachdiffusion aus der Badlösung und benachbarten Elementen gegeben ist. Es gilt (Barry und Adrian, 1973):

$$f(t, c_n) = a1_n \cdot (c_{n-1}(t) - c_n(t)) - a2_n \cdot (c_n(t) - c_{n+1}(t)) - a3_n \cdot I_n^{trans}(t) \quad (108)$$

mit den Koeffizienten

$$\begin{aligned} a1_n &= D_{Ca}^{eff} (m - n + 1) / ((\Delta r)^2 \cdot (m - n + 0.5)) \\ a2_n &= D_{Ca}^{eff} (m - n) / ((\Delta r)^2 \cdot (m - n + 0.5)) \\ a3_n &= a / (\rho \cdot F \cdot (\Delta r)^2 \cdot (m - n + 0.5)) \end{aligned} \quad (109)$$

An der Faseroberfläche ( $n=1$ ) gilt für die Gleichung

$$f(t, c_1) = a1_n \cdot (c_0(t) - (c_1(t) + 0.5 \cdot (c_1(t) - c_2(t))) - a2_1 \cdot (c_1(t) - c_2(t)) - a3_1 \cdot I_1^{trans}(t) \quad (110)$$

wobei der erste Koeffizienten an der Faseroberfläche vom Eingangswiderstand und der radialen Leitfähigkeit abhängt (Barry und Adrian, 1973):

$$a1_1 = (m \cdot D_{Ca}^{eff}) / (\Delta r \cdot r_s \cdot \bar{G}_L \cdot (m - 0.5)). \quad (111)$$

Die Runge-Kutta-Koeffizienten berechnen sich wie folgt:

$$K1_n = \Delta t \cdot f(t, C_n) \quad (112)$$

$$K2_n = \Delta t \cdot f\left(t + \frac{\Delta t}{2}, C_n + \frac{K1_n}{2}\right) \quad (113)$$

$$K3_n = \Delta t \cdot f\left(t + \frac{\Delta t}{2}, C_n + \frac{K2_n}{2}\right) \quad (114)$$

$$K4_n = \Delta t \cdot f(t + \Delta t, C_n + K3_n). \quad (115)$$

Der Strom  $I_n^{trans}$  der in Ring  $n$  durch die TTS Wand in die Faser fließt ist durch die folgende Gleichung gegeben:

$$I_n^{trans}(t) = G_n(t) \cdot V_n^{rel}(t) \quad (116)$$

wobei (nach Barry und Adrian, 1973)

$$V_n^{rel}(t) \equiv V(t) - E_{ion} = V_0 - V_n(t) - \frac{RT}{z \cdot F} \ln\left(\frac{c_n(t)}{c_0}\right) \quad (117)$$

bzw. (siehe vorheriger Abschnitt)

$$V_n^{rel}(t) \equiv V_{clamp} - V_n(t) - \frac{RT}{z \cdot F} \ln\left(\frac{c_n(t)}{c_{in}}\right) \quad (118)$$

die treibende Kraft (*driving force*) für den Ionenstrom ist, und

$$G_n(t) = \bar{G}_w(t) \cdot \hat{g}(V) \cdot (\Delta r)^2 (m - n + 0.5) / a \quad (119)$$

die Leitfähigkeit in Ring  $n$  ist.  $V_n$  ist die Spannung zwischen dem Zentrum von Ring  $n$  und der Badlösung. Sie wird durch die Gleichung (Barry und Adrian, 1973)

$$V_{n+1}(t) = V_n(t) - \frac{I_n^{radial}(t) \cdot a \cdot \ln \left\{ \frac{m-n+0.5}{m-n-0.5} \right\}}{G_L} \quad (120)$$

beschrieben, wobei  $I_n^{radial}(t)$  den Strom bezeichnet, der in radialer Richtung aus Ring  $n$  zum Faserzentrum fließt. Er setzt sich, wie in Abbildung 19 gezeigt, aus dem Ausstrom  $I_n^{trans}$  und der Nachdiffusion aus dem benachbarten Ring  $I_{n-1}^{radial}(t)$  zusammen:

$$I_n^{radial}(t) = I_{n-1}^{radial}(t) - I_n^{trans}(t) \quad (121)$$

Die Dicke eines einzelnen Ringelements ergibt sich konsequenterweise durch Aufteilung des Faserradius  $a$  in  $m$  Abschnitte:

$$\Delta r = \frac{a}{m} \quad (122).$$

Die Berechnung des Gesamtstroms  $I_{sim}^{unbuff}(t)$  beruht auf der Annahme, daß im Zentrum der Faser zu keiner Zeit ein Strom in radialer Richtung fließen soll (Barry und Adrian 1973):

$$I_m^{radial}(t) = 0 \quad (123)$$

oder

$$\Delta I = I_{m-1}^{radial} - I_m^{trans} = 0 \quad (124)$$

Der Algorithmus berechnet nun  $\Delta I = I_{m-1}^{radial} - I_m^{trans}$  solange, bis die Differenz als “hinreichend klein” angesehen wurde, d.h. in der Praxis bis das Kriterium  $\Delta I \leq 10^{-20}$  erfüllt war.

Der zugehörige Quellcode der *current finding* Subroutine hat die folgende Form:

```
v[1]=-zi*(ra+rfac[1]);
vmek=dum[1]-v[1];

if (fitflag==Auswahl) // Spannungsabhängigkeit
{
    gkt= jeweilige Spannungsabhängigkeit
}
zit[1]=-zifac[1]*vmek*gkt*gbw;
zir[1]=zi-zit[1];
for (n=2; n<=ml; n++)
{
    v[n]=v[n-1]-zir[n-1]*rfac[n];
    vmek=dum[n]-v[n];
    zit[n]=-zifac[n]*vmek*gkt*gbw;
    zir[n]=zir[n-1]-zit[n];
};
v[m]=v[ml]-zir[ml]*rfac[m];
vmek=dum[m]-v[m];
zit[m]=-zifac[m]*vmek*gkt*gbw;
```

Zur Berechnung des Gesamtstroms durch die gesamte Zellmembran werden die Ströme durch die TTS-Membran  $I_{TTS}$  und durch die „scheinbare“ Oberfläche  $I_{ASM}$  addiert.

Zur Berechnung der Kaliumströme wurde das oben geschilderte Verfahren jeweils für die TTS-Membran und die ASM-Membran durchgeführt. Die Konzentrationsänderungen im TTS und im schmalen Bereich um die Faser herum im Extrazellulär-Raum wurden getrennt berechnet.

## 2. Adaptive Fehlergrenzen

Der tolerierte Fehler wurde durch adaptive Fehlergrenzen minimiert, d.h. sobald das weiter oben angegebene Abbruchkriterium bereits im ersten Iterationsschritt erfüllt war wurde der absolute Fehler um 1% reduziert. Bei einer Schrittweite von  $\Delta t = 10^{-7}$  wurde der Fehler also innerhalb von 0.1 msec „Echtzeit“ (entspricht 1000 Schritten) bereits um den Faktor  $0.99^{1000}$  bzw.  $1/23100$  reduziert. In der Praxis traten allerdings maximal 50 Korrekturen hintereinander auf, was eine Reduktion des Fehlers um 60% bedeutet. Danach wurden mindestens 2 Iterationsschritte durchlaufen.

Falls der Algorithmus nicht innerhalb einer maximalen Anzahl von Iterationen ( $MAXIT = 2 \cdot 10^5$ ) auf einen Wert innerhalb der Fehlergrenzen konvergierte wurde der Fehler um einen Faktor 10 erhöht. Die war insofern zulässig, da der Wert im Allgemeinen nicht divergierte, sondern lediglich zwischen einem positiven und negativen Wert knapp oberhalb (+50% bis +600%) des maximalen Fehlers oszillierte. Die Oszillation trat aufgrund der endlichen Rechengenauigkeit (*float*, 32 bit Fließkomma) auf. Eine Erweiterung des Variablenbereiches auf 64 bit Fließkomma (*double*) und auf 80 bit Fließkomma (*long double*) brachte keine wesentliche Verbesserung.

Ein Beispiel, die Fehlergrenze für den maximalen Fehler liegt hier bei  $error = 10^{-20}$  bzw. in Fließkommadarstellung bei `error=1e-20`:

```
2.245254e-20
-5.3471234e-20
2.245254e-20
-5.3471234e-20
...
```

Die Routine der adaptiven Fehlergrenzen sieht im Quellcode wie folgt aus:

```
k=0;
while((er-error)>0)
```

```

{
  k++;
  [... führe Berechnungen durch (siehe oben)]
  di=zir[m1]-zit[m];
  er=fabs(di);
  if(k == MAXIT)          // toleriere 10fachen Fehler
  {
    error=error*10;
    k=0;
  }

  if ((er-error) > 0) zi-=di/5; // repeat while loop
  if(k<=1)                // Wenn Bedingung schon in der 1. Iteration erfüllt
  error=error*0.99; // dann reduziere den Toleranzbereich um 1%
}

```

### 3. Intrazelluläre Konzentrationsänderungen

#### a) $Ca^{2+}$

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt wurde, wird nur der Beitrag des zusätzlichen  $Ca^{2+}$ -Einstroms in das Myoplasma berücksichtigt. Obwohl die tatsächliche Situation insgesamt wesentlich komplexer ist, kann die in dieser Arbeit relevante intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderung mit der folgenden Gleichung modelliert werden (siehe auch Seite 64):

$$c_{in}(t + \Delta t) = c_{in}(t) + \Delta t \cdot \frac{A_{TTS}}{V_{myo}} \frac{I_{sim}^{unbuff}(t)}{2 \cdot F} \cdot \prod_j B_j \quad (125)$$

wobei  $A_{TTS}$  die Fläche der TTS-Membran ist und  $V_{myo}$  das Volumen der Faser darstellt:

$$\frac{A_{TTS}}{V_{myo}} = \frac{2\pi \cdot a \cdot l \cdot \phi_T}{(1 - \rho) \cdot \pi \cdot a^2 \cdot l} \quad (126)$$

Nimmt man ein Verhältnis von  $A_{TTS}$  zu  $A_{gesamt}$  von  $2/3$  an (Gage, 1965) und berücksichtigt man die Tatsache, daß beim Säuger zwei TTS-Schläuche pro Sarkomer vorhanden sind, erhält man für eine idealisierte zylindrische Faser einen Wert von  $\phi_T = 4$ .

#### b) $K^+$

Die Berechnung der intrazellulären Konzentrationsänderung beim  $K^+$ -Einstrom ist relativ einfach. Die numerische Umsetzung erfolgt gemäß:

$$c_{in}(t + \Delta t) = c_{in}(t) + \Delta t \cdot \frac{1}{F} \left[ \frac{A_{TTS}}{V_{myo}} I_{TTS}(t) + \frac{A_{ASM}}{V_{myo}} I_{ASM}(t) \right] \quad (127)$$

wobei  $c_{in}$  die intrazelluläre Konzentration ist,  $F$  ist die Faradaykonstante,  $A_{TTS}$  und  $A_{ASM}$  bezeichnen die Fläche der TTS bzw. der Oberflächenmembran,  $V_{myo}$  ist das intrazelluläre Volumen,  $I_{TTS}$  und  $I_{ASM}$  entsprechen den Kaliumströmen durch die TTS bzw. Oberflächenmembran. Hierbei steht „Oberflächenmembran“ wiederum für die gesamte Membranfläche ohne die TTS-Membran.

Es gilt

$$\begin{aligned} I_{TTS}(t) &= \sum_n I_n^{trans}(t) \\ I_{ASM}(t) &= \hat{g}_K(V) \cdot \frac{V_{clamp} - E_K(t)}{R_{sm}(t)} \end{aligned} \quad (128)$$

mit der spannungsabhängigen Leitfähigkeit

$$\hat{g}_K(V) = (A_1 - A_2) \cdot \exp(\dots) / \left( \{1 + \exp(\dots)\}^2 \cdot k \right). \quad (129)$$

mit  $\exp(\dots) = \exp((V_{0.5} - V)/k)$ .

#### 4. Konvergenz-Test des Algorithmus: Diffusionsgleichung und deren Lösung

Der Algorithmus wurde auf seine Konvergenz getestet. Dazu wurde die zeitliche Entwicklung der radialen Konzentrationsverteilung untersucht, die sich einstellt wenn die initiale Konzentration im TTS auf Null gesetzt wird. Dazu wurde die extrazelluläre Konzentration in einem Sprung von  $[Ca^{2+}]_{ext} = 0$  mM auf  $[Ca^{2+}]_{ext} = 10$  mM geändert und die radiale Eindiffusion aus der Extrazellulär-Lösung in das TTS berechnet.

Wie bereits erwähnt, führt der geringe Radius des TTS-Schlauches zu einer verminderten Diffusionskonstante für  $Ca^{2+}$ -Ionen. Sehr umfangreiche Untersuchungen für die Diffusion von Materialien unterschiedlicher Größe in engen Röhren finden sich in der Arbeit von Nitsche et al. (1994).

Die Diffusionskonstante im Inneren des TTS-Schlauches wird wie folgt modifiziert:

$$\frac{D_{Ca}^{TTS}}{D_{Ca}} = \frac{1 + 1.125 \beta \ln \beta - 1.539 \beta + 1.2 \beta^2}{(1 - \beta)^2}, \quad (130)$$

wobei  $\beta = \frac{radius_{Ca^{2+}}}{radius_{TTS}}$  das Verhältnis der Radien des  $Ca^{2+}$ -Ions und des TTS bezeichnet.

Mit den Werten  $radius_{Ca^{2+}} = 0.106$  nm (Emsley, 1989) und  $radius_{TTS} = 25$  nm reduziert sich der Diffusionskoeffizient von  $D_{Ca} = 7 \cdot 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s für eine freie Diffusion von  $Ca^{2+}$ -Ionen (Can-

nell und Allen, 1984) auf  $D_{Ca}^{TTS} = 6.83 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Durch die netzartige Struktur des TTS muß der Diffusionskoeffizient mit einem dimensionslosen Netzwerkfaktor  $\sigma$  multipliziert werden (Adrian et al. 1969a). Somit lautet die Gleichung für die radiale Konzentrationsänderung:

$$\frac{\partial c(r,t)}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r D_{Ca}^{eff} \frac{\partial c(r,t)}{\partial r} \right) \quad (131)$$

wobei  $D_{Ca}^{eff} = \sigma D_{Ca}^{TTS}$  die angepaßte Diffusionskonstante ist mit den folgenden Bedingungen:

Randbedingung  $c = c_0$  für  $r \geq a$  bei  $t \geq 0$

Anfangsbedingung:  $c = 0$  für  $0 \leq r < a$  bei  $t = 0$ .

Die Lösung der Gleichung mit den oben angegebenen Anfangs und Randbedingungen lautet (Crank, 1975)

$$\frac{c(r,t)}{c_0} = 1 - \frac{2}{a} \sum_{n=1}^{\infty} e^{(-\lambda_n^2 D_{ion}^{eff} t)} \cdot \frac{J_0(r\lambda_n)}{J_1(a\lambda_n)} \quad (132)$$

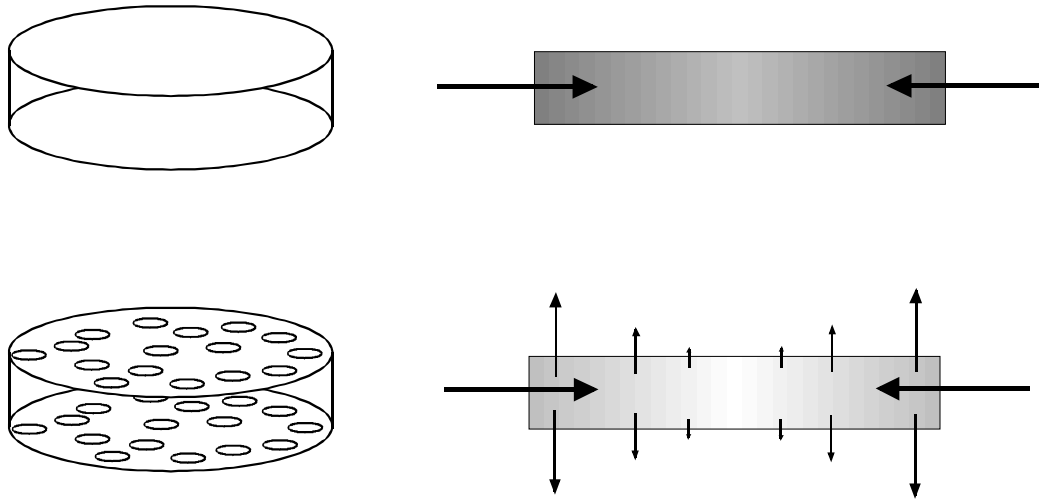
wobei  $J_0$  und  $J_1$  die Besselfunktionen nullter bzw. erster Ordnung sind, und  $\lambda_n$  positiven Lösungen von  $J_0(a\lambda_n)=0$  sind.

Die Ergebnisse der Simulation sind zusammen mit der analytischen Lösung in Abschnitt A im Kapitel ERGEBNISSE gezeigt, siehe (Abbildung 27, Seite 92).

Im nächsten Schritt wird ein System betrachtet, bei dem der Scheibenrand selbst für die Ionen durchlässig ist. Dieses Modell ist eine erste Näherung für die Beschreibung des transversalen tubulären Systems des Skelettmuskels (Adrian et al. 1969) bei dem ein Ionenstrom durch die Membran des TTS ins Faserinnere fließt.

Die folgende Abbildung zeigt qualitativ, wie sich die Konzentration ohne (oben) und mit (unten) einer durchlässigen Membran entwickeln wird:





**Abbildung 21:** Links: Scheibenmodell ohne (oben) und mit (unten) radialer Leckleitfähigkeit, rechts: qualitative Konzentrationsverteilung.

Bei der exakten Berechnung der Konzentrationsverteilung für den stationären Zustand der oben gezeigten Situation kann die radiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsverteilung im Inneren des TTS bei der Untersuchung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen mit Hilfe der von Almers et al. (1981) beschriebenen Gleichung

$$\kappa \frac{\partial^2 [\text{Ca}^{2+}]}{\partial r^2} + \frac{\kappa}{r} \frac{\partial [\text{Ca}^{2+}]}{\partial r} = \frac{A}{\rho} [\text{Ca}^{2+}] + \frac{\partial [\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} \quad (133)$$

berechnet werden, wobei  $\kappa = \sigma D$  und  $\rho$  der Bruchteil des TTS-Volumens bezogen auf das Faservolumen ist, und  $A$  die Proportionalitätskonstante für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux Gleichung. Weitere Details finden sich in der Arbeit von Almers et al. (1981).

Die Lösung der obigen Gleichung für den stationären Zustand lautet (Falk, 1968; Adrian *et al.*, 1969a; Almers *et al.*, 1981):

$$\frac{[\text{Ca}^{2+}](r)}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}} = \frac{I_0(r/\lambda_T)}{I_0(a/\lambda_T)} \quad (134)$$

wobei

$$\lambda_T = \left( \frac{\rho \cdot \kappa}{A} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (135)$$

die Längenkonstante des Profils der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Scheibe (oder auch die Eindringtiefe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen) bezeichnet. Sie gibt eine mittlere Distanz an, die ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion im

Inneren der Scheibe in Richtung Scheibenmitte zurücklegt, bevor es aus der Scheibe herausfließt. Im Skelettmuskel entspricht das einem Ionenfluß aus dem TTS durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (L-Type DHP-Rezeptor) in das Sarkoplasma (Almers et al., 1981). Die Gleichung kann also dazu benutzt werden um die theoretische Ionenverteilung im Inneren der Scheibe im stationären Zustand zu berechnen.

## **D. Datenerfassung**

Die Datenerfassung im Experiment an Mausfasern erfolgte direkt digital. Hier war ein D/A Board in einem handelsüblichen PC eingebaut, das die analogen Verstärker-Daten direkt in digitale Daten umwandelte. Die Erfassung, Speicherung und Vorbearbeitung der Daten wurde mit der Software pClamp6 (Axon Instruments) durchgeführt.

Die von Almers et al. (1981) mit der *Vaseline-Gap* Methode aufgenommenen experimentellen Daten wurden auf photographischem Film gespeichert.

Im Experiment mit den erschöpften Froschfasern wurden die Daten auf einem Speicher-Oszilloskop (Tektronics 564B) angezeigt und ebenfalls photographisch festgehalten.

### **1. Hardware und Softwaretools**

Die Simulationen des *depletion*-Programms wurden auf einer SGI Octance Workstation mit R10000 Prozessor (Silicon Graphics, IRIX 6.4) durchgeführt. Der Algorithmus wurde in einem C++ Programm implementiert, das mit dem SGI C++ Compiler für R8000 Systeme und den Compiler Optionen `-n32`, `-64`, `-mips3` oder `-mips4` compiliert wurde. Die Differentialgleichungen wurden mit der Runge-Kutta Methode in vierter Ordnung integriert (Ralston et al., 1965). Die Stabilität und die Konvergenz des Algorithmus wurden getestet. Die Kriterien wurden mit einem  $\Delta t = 10^{-7}$  für  $m=50$  Ringe bzw. einem  $\Delta t = 10^{-10}$  für  $m=200$  Ringe erfüllt.

Um eine eventuelle Plattformabhängigkeit auszuschließen, wurde die Simulation auch unter WinNT mit dem Microsoft C++ Compiler compiliert und ausgeführt.

Die Ergebnisse der Simulation wurden mit Origin 5.0 (Microcal Software Inc. Northampton USA) auf einem handelsüblichen WindowsNT System (Siemens Nixdorf, Celsius 2000E) mit PII Prozessor und unter Windows95 auf älteren Rechnern mit P90 Prozessor ausgewertet.

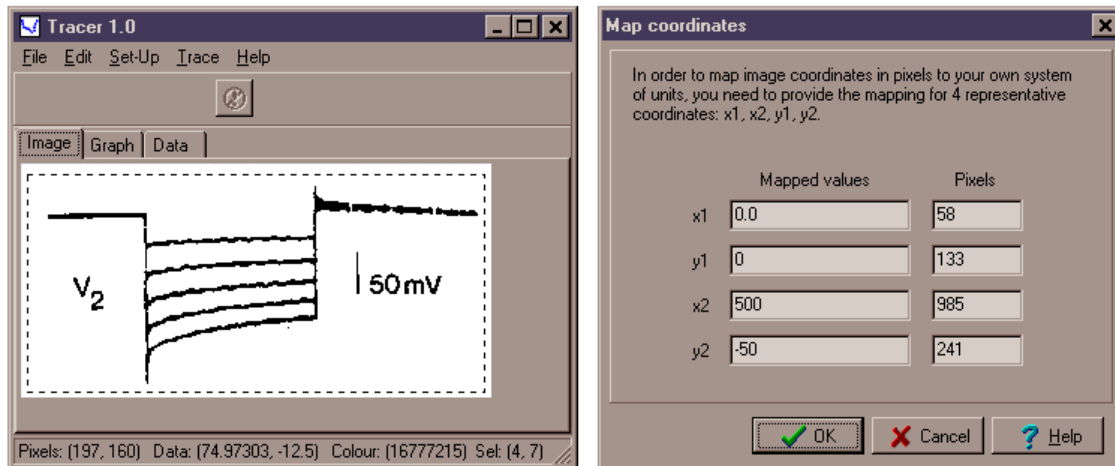
Die analytische Lösung der zeitlichen Entwicklung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Eindiffusion in das TTS wurde mit Maple V Rel.3 (Waterloo Maple Inc, Ontario Canada) berechnet, wobei die unendliche Summe durch die ersten 100 Glieder angenähert wurde (Uttenweiler *et al.* 1998).

### **2. Umwandlung analoger Papierplots in digitale Computerfiles**

Zur Weiterverarbeitung in der Simulation wurden die analog aufgenommenen Meßdaten in digitale Computerfiles umgewandelt. Dazu wurden sie mit einem handelsüblichen Scanner aufgenommen und vorverarbeitet (Paintshop Pro 4.12, JASC Inc).

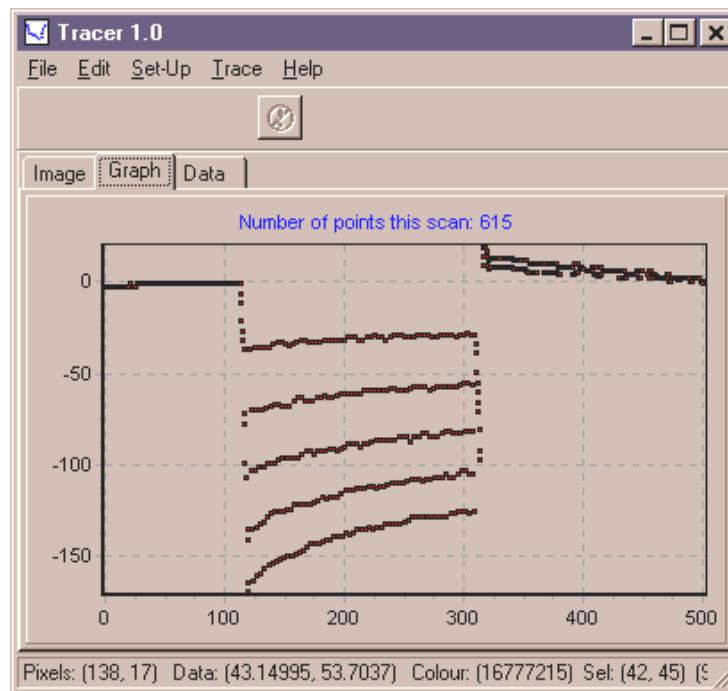
Die Bilder wurden im Bitmap Format abgelegt und mit der Software Tracer Vers. 1.0 (Autor Marcus Karolewski, MIT, USA, Freeware) analysiert.

Dabei wurden den gescannten Bildern direkt die Dimensionen der Meßdaten zugewiesen.



**Abbildung 22:** Screenshot der Tracer Software. Eingelesenes Bild und zugehörige Koordinaten.

Bei der automatischen Erkennung wird das Bild zeilenweise abgetastet und für jeden schwarzen „Bildpunkt“ wird ein Datenpaar mit den jeweiligen Koordinaten abgespeichert. Die Größe eines „Bildpunktes“ in absoluten Pixeln des digitalen Bildes kann in einem getrennten Menü mit ( $x\_size$ ,  $y\_size$ ) festgelegt werden. In der Praxis haben sich für die gescannten Photographien mit einer original Bildgröße von 314 x 156 Pixeln und einer internen Auflösung von 942 x 468 Pixeln Werte von  $x\_size=10$  und  $y\_size=8$  als ideal herausgestellt.



**Abbildung 23:** Graphische Ausgabe der digitalisierten Meßwerte (Tracer Vers. 1.0).

Die von der Software ermittelten Datenpaare ( $x$ ,  $y$ ) wurden im ASCII-Format exportiert und mit der Software Origin 5.0 (Microcal) weiterverarbeitet, d.h. graphisch dargestellt und mit den Simulationsdaten verglichen (siehe auch Abschnitt E, Seite 83)

### 3. Dateiformate

In diesem Abschnitt werden die Dateiformate der benutzten Dateien vorgestellt. Es handelt sich dabei um die Eingabedatei der Meßdaten  $*f\_in$ , die Standardausgabedatei  $*f\_out$ , die Ausgabedatei für die radiale Konzentrationsverteilung  $*f\_rad$  sowie die Eingabedatei mit den Kontrollspannungen  $*f\_volt$ .

Die Meßdaten wurden entweder mit pCLAMP6 aufgenommen und im ASCII-Format exportiert oder wie im vorherigen Abschnitt beschrieben digitalisiert und ebenfalls im ASCII-Format gespeichert. Bei der digitalen Aufnahme waren die Zeit in Millisekunden und die Spannung in Nanoampère gegeben. Diese Meßdaten wurden eingelesen, auf die Membranstromdichte normiert und zur Kontrolle in  $\mu A/cm^2$  in ein Ausgabefile  $*f\_nin$  gespeichert.

Die folgende Tabelle zeigt die Dateiformate der benutzten Dateien.

<i>Beschreibung</i>	<i>Name</i>	<i>Struktur</i>	<i>Einheit</i>	<i>Typische Größe</i>
Standard Eingabedatei der experimentellen Meßdaten	*f_in	Int time Float current	sec nA	8 kB
Eingabedatei der Kontrollspannungen	*f_volt	Int time Float voltage	sec mV	8 kB
Standard Ausgabedatei	*f_out	Float time Float current_total Float current_TTS Float voltage Float avg_concentration	msec $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ mV mM	von 28 kB bis 400 kB
Ausgabe der radialen Konzentration	*f_rad	float c[1] float c[2] ... float c[m]	mM mM ... mM	112 kB bis 2.4 MB
Parameterausgabe	*f_para	Text		1 kB

Für die umfangreichen Parametervariationen wurden den Dateien automatisch mit der Routine `filenames(int lauf)` durchnummerierte Dateinamen zugewiesen.

```
FILE *f_volt,*fhandle,*f_out,*f_in,*f_para,*f_rad,*f_nin;
char* in_name="c:\\deplpaper\\data\\alt\\faser98.dat"; char*
volt_name="c:\\deplpaper\\data\\step_1400.dat"; char
out_name[150],para_name[150],rad_name[150],nin_name[150];
char pathname[100]="c:\\deplpaper\\data\\";
char f_name[20]="f98_tau40_sim_r0";

void filenames(int lauf)
{
char nummer[10];
sprintf(nummer,"%i",lauf);
strcpy(out_name,pathname);
strcat(out_name,f_name);
strcat(out_name,nummer);
strcpy(para_name,out_name);
strcpy(rad_name,out_name);
strcpy(nin_name,out_name);
strcat(out_name,".dat");
strcat(rad_name,".rad");
strcat(para_name,".par");
strcat(nin_name,"_in.dat");
}
```

Die Parameter wurden im Parameterfile gespeichert. Ein typischer Eintrag sieht wie folgt aus:

```
Inputfile:c:\\deplpaper\\data\\alt\\faser98.dat
Outputfile:c:\\deplpaper\\data\\f98_sim_r0_5.dat
This file:c:\\deplpaper\\data\\f98_sim_r0_5.par

dt_factor: 3, rings: 40, err: 3.37942e-021
Temperature (°C):20, Peak_current: -5.59666e-005, Co(mM): 10, E_rest(mV):144
```

```
Fibre radius( $\mu\text{m}$ ):35, Fiber length ( $\mu\text{m}$ ):650, activation tau(sec): 0
sigma:0.375, rho:0.005, f_T:0.999, rsm(ohm cm2):2.57296e+006
ra(ohm cm2):0, gbw(mmho/cm3):227.009, dr( $\mu\text{m}$ ):0.875 D( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ):6873.86,
gbl:1.5e-005
current_factor:1e+009 dt_factor:3 time_factor:1000 dt:0.000833

inputfile contained raw data, currents are convertet to surface densities
surface membrane ( $\mu\text{m}^2$ ):142942
resulting normfactor (output current in A/cm2):6.99582e-007
in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ :0.699582
```

---

## E. Verfahren zur Optimierung der Simulations-Parameter

### a) $Ca^{2+}$

Um eine quantitative Aussage über die Güte der Übereinstimmung des Simulations-Outputs  $I_{sim}^{unbuff}(t)$  mit den in ungepufferten Lösung aufgenommenen Meßdaten  $I_{exp}^{unbuff}(t)$  treffen zu können wurde für jede Parameterkombination der quadratische Fehler sowie der Kehrwert des mittleren quadratischen Fehlers bestimmt.

Dabei wurde  $I_{sim}^{unbuff}(t)$  für jedes Wertepaar  $(r_s, \rho)$  aus einem Parameterraum von  $\Pi = R \times P$  mit  $\|R\| = 1100$  und  $\|P\| = 200$  (entspricht 220.000 Kombinationen) berechnet und mit der Messung  $I_{exp}^{unbuff}(t)$  verglichen. Der Wertebereich der Parameter war wie folgt definiert:

- Eingangswiderstand:  $R = \{r_s \mid r_s \in [0..1000], \Delta r_s = 1\}$  und
- Volumenanteil pro Gesamtvolumen:  $P = \{\rho \mid \rho \in [0.001..0.1], \Delta \rho = 0.0005\}$ .

Danach wurde für jeden der 512 Simulationswerte der Fehler im Vergleich zum Meßwert bestimmt. Dabei wurde entweder der Betrag

$$x_j = |I_j^{sim} - I_j^{exp}|, j = 1..512 \quad (136)$$

oder der quadratische Fehler

$$y_j = (I_j^{sim} - I_j^{exp})^2, j = 1..512 \quad (137)$$

bestimmt. Das Maß für die Güte war der Kehrwert des mittleren Fehlers (bzw. des mittleren quadratischen Fehlers)

$$X = \frac{1}{\bar{x}} = \frac{1}{\frac{1}{512} \cdot \sum_{j=1}^{512} x_j} = \frac{1}{\frac{1}{512} \cdot \sum_{j=1}^{512} \sqrt{(I_j^{sim} - I_j^{exp})^2}} = \max.$$

bzw.

$$Y = \frac{1}{\bar{y}} = \frac{1}{\frac{1}{512} \cdot \sum_{j=1}^{512} y_j} = \frac{1}{\frac{1}{512} \cdot \sum_{j=1}^{512} (I_j^{sim} - I_j^{exp})^2} = \max.$$

dessen Wert maximal wird bei einem minimalen Fehler.



b)  $K^+$

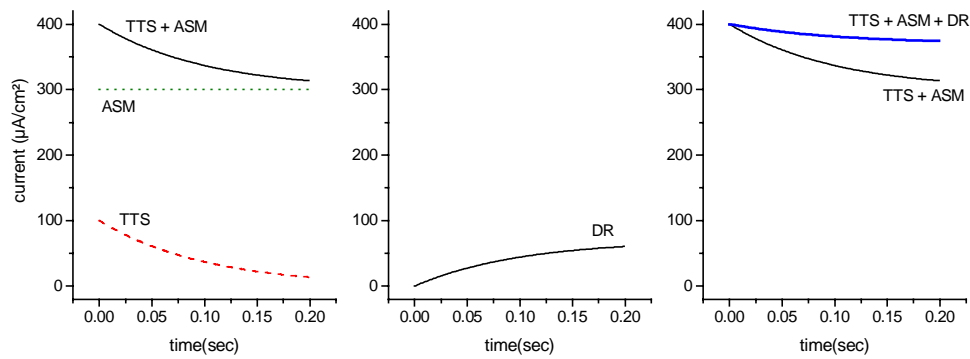
Bei der Auswahl der Parameter zur Beurteilung der Leitfähigkeitsverteilung wurde auf ähnliche Weise vorgegangen. Dabei mußte zusätzlich berücksichtigt werden, daß die gemessenen Kaliumströme der erschöpften Faser in Realität nicht ausschließlich Ströme durch den ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanal darstellen.

In einem ersten Schritt wurden die Ströme mit einer variablen Kanaldichte  $\vartheta$  berechnet, ohne eine Konzentrationsänderung an der ASM-Membran explizit zu berücksichtigen. Die so berechneten TTS-Ströme wurden dann mit den experimentellen Messdaten in einem ersten Schritt verglichen. Dabei wurden die Amplituden und die Kinetik der *Tail-currents* analog dem Verfahren zur Anpassung der Parameter für  $Ca^{2+}$ -Ströme analysiert. Zur Berechnung des Verhältnisses  $\vartheta$  wurde die Amplitude der *Tail-currents* bei depolarisierenden Pulsen mittlerer Spannung benutzt.

Da die Ergebnisse der *Tail-currents* Simulation bei Hyperpolarisation im Vergleich zu den Messungen eine schnellere Kinetik aufweisen, wurde zusätzlich eine Konzentrationsänderung in unmittelbarer Nähe der ASM-Membran postuliert und die Amplituden angepasst.

Die restliche Differenz zu den experimentellen Daten wurde durch zusätzliche Ströme kompensiert: bei der Hyperpolarisation wurden auch inaktivierende Ströme postuliert (Adrian et al., 1970; Almers 1972a,b), bei der Depolarisation wurde ein nachträglich aktivierender Strom durch den *Delayed Rectifier* addiert (siehe z.B. Wallinga et al., 1999 als Übersicht).

In der folgenden Abbildung ist schematisch gezeigt, wie die einzelnen Komponenten (Strom durch die TTS-Membran (TTS), Strom durch die „scheinbare“ Oberflächenmembran (ASM), Strom durch den *Delayed Rectifier* (DR) der Oberflächenmembran) zur Entwicklung des Gesamtstroms (TTS+ASM+DR) bei Depolarisation beitragen.



**Abbildung 24:** Schematische Darstellung der zusätzlichen Komponenten bei Depolarisation.

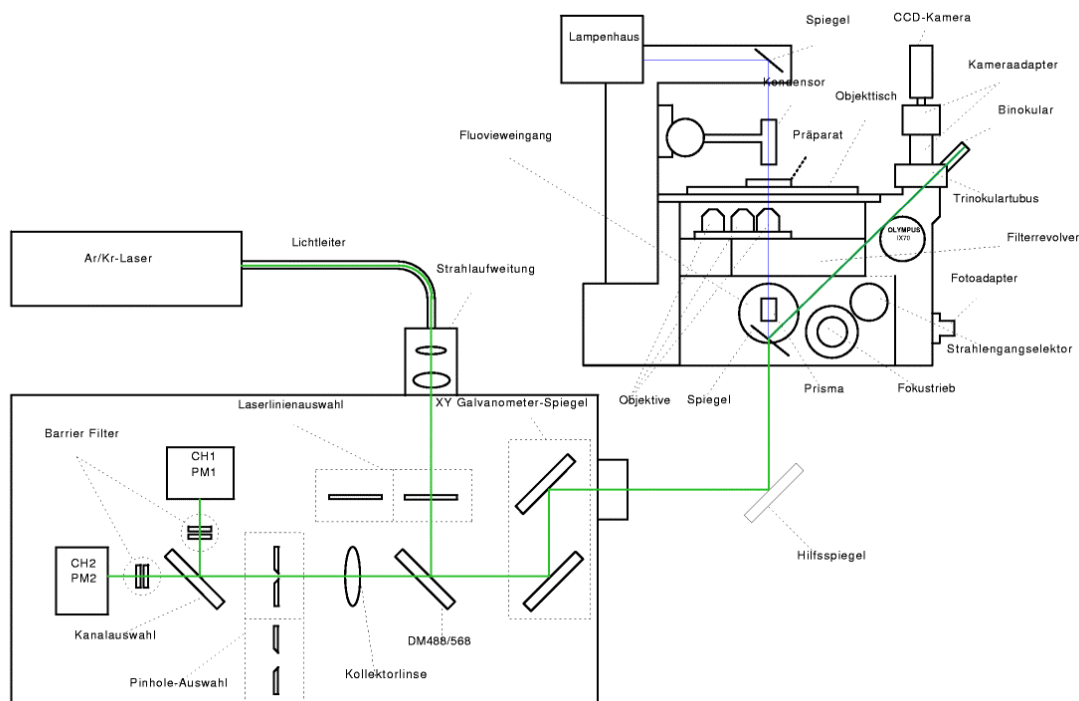
Weiteres dazu siehe auch im Kapitel ERGEBNISSE und im Kapitel DISKUSSION.

## F. Messung der extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

Zur Messung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im TTS muß aufgrund der geringen Abmessungen des transversen tubulären Systems konfokale Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die zeitliche Auflösung zur dynamischen Untersuchung der zeitlichen Konzentrationsänderung im TTS nicht ausreicht. Eine zusätzliche Beschränkung folgt durch die Kontraktion der Faser, die zu Bewegungsartefakten führt (siehe auch im Kapitel DISKUSSION, ab Seite 165)

### 1. Konfokales Setup

Eine detaillierte Beschreibung des konfokalen Prinzips findet sich im „Handbook of Biological Confocal Microscopy“ von James Pawley (1995), spezielle Betrachtungen zu dem von mir benutzten Setup (Fluoview, Olympus IX-70) hat Markus Feierabend (1999) dargestellt. In der folgenden Abbildung ist der schematische Aufbau des Systems gezeigt.



**Abbildung 25:** Schematischer Aufbau zur Messung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit konfokaler Mikroskopie (aus Feierabend, 1999).

## 2. Farbstoff X-Rhod 5N

Ein geeigneter Farbstoff zur Untersuchung der extrazellulären Konzentrationsänderungen ist eine Rhodamin-Variante die eine sehr hohe Sättigungskonstante aufweist ( $K_d = 350 \mu\text{M}$ ) und bei einer geeigneten Wellenlänge (488 nm oder 568 nm) angeregt werden kann.

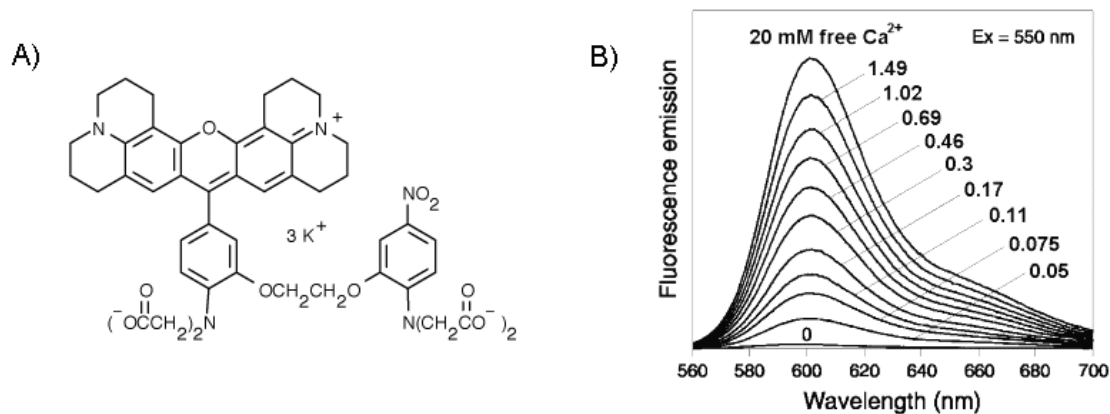


Abbildung 26: A) Struktur und B) Spektrum des Fluoreszenzfarbstoffs X-Rhod 5-N (Molecular Probes)

## 3. Fluoreszenzfarbstoff-Lösung

Zur Untersuchung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde ein Lösungswechsel von normaler Ringerlösung auf die Fluoreszenzfarbstoff-Lösung durchgeführt. Dabei wurde die Ringerlösung aus der Meßkammer mit einer Pasteurpipette manuell abgesaugt. Sofort im Anschluß wurden 500  $\mu\text{l}$  der Fluoreszenzfarbstoff-Lösung am Rand der Meßkammer zupipetiert, um möglichst Bewegungsartefakte durch den Lösungswechsel auszuschließen.

Die Konzentrationen sind in mM angegeben:

**Fluoreszenzfarbstoff-Lösung:** 140 NaCl; 4 KCl; 2 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES; 11 Glucose. Zusätzlich 1  $\mu\text{M}$  X-Rhod-5N (Molecular Probes)

Der pH wurde mit NaOH oder Ameisensäure auf einen Wert von  $7.40 \pm 0.02$  eingestellt.

#### **4. Bildaufnahme**

Die Bildaufnahme erfolgte mit der Fluoview-Software von Olympus. Die Übersichtsbilder im Reflektionsmodus wurden bei der grünen Laserlinie aufgenommen. Die Zeitserien bzw. x-y-Stacks wurden im Fluoview eigenen 12-Bit TIFF Format gespeichert und als Einzelbilder in das TIFF – Format mit 8 bit Auflösung exportiert. Die Nachbearbeitung der Bilder erfolgte entweder mit der NIH-Image Software (WindowsNT-Version von Scionimage, NIH, USA) oder mit handelsüblicher Bildbearbeitungssoftware (Paintshop Pro 4.12).

## IV. Ergebnisse

Die numerische Ausgabe des neu entwickelten Computerprogramms zur Berechnung der Konzentrationsänderungen im TTS und deren Einfluß auf den Stromverlauf bei *Voltage-Clamp* Experimenten kann in zwei große Bereiche aufgeteilt werden:

- i) theoretische Vorhersagen und
- ii) Anwendung in experimentellen Situationen.

Im ersten Schritt (Abschnitt B) wird anhand einer idealisierten Modellfaser der Einfluß verschiedener relevanter Faserparameter auf die Konzentrationsänderung im TTS und somit auf den Stromverlauf untersucht. Hierbei wird im Wesentlichen auf die theoretischen Vorhersagen des Modells für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme am Säugermuskeln eingegangen.

Auf detailliertere Untersuchungen der theoretischen Vorhersagen bei Kaliumströmen an erschöpften Froschfasern wird in Abschnitt E eingegangen, weitere Details finden sich auch in meiner Diplomarbeit (Ehmer, 1997).

Die allgemeinen Umgebungsparameter, die bei der Untersuchung für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme benutzt werden, sind in Tabelle 5 dargestellt.

<i>Parameter</i>	<i>Symbol und Wert</i>	<i>Referenz</i>
Freie $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusionskonstante	$D_{\text{Ca}}^{\text{free}} = 7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	a)
$\text{Ca}^{2+}$ -Diffusionskonstante im tubulären Lumen	$D_{\text{Ca}}^{\text{TTS}} = 6.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	b)
Effektive radiale Diffusionskonstante im TTS	$D_{\text{Ca}}^{\text{free}} = 2.59 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	
Extrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}} = 10 \text{ mM}$	
Intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}} = 100 \text{ nM}$	
Gleichgewichtspotential (20°C)	$E_{\text{Ca}} = +144 \text{ mV}$	Nernst Gleichung
Network factor	$\sigma = 0.375$	c)
Leitfähigkeit des tubulären Lumens	$G_L = 0.01 \text{ S/cm}$	c), d)
Typische maximale Stromdichte	$\hat{I}_{\text{Ca}} = 100 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$	e), f)

**Tabelle 5:** Allgemeine Umgebungsparameter zur Simulation in Abschnitt B und C.

Referenzen: a) Cannell und Allen, 1984; b) Nitsche und Balgi, 1994; c) Barry und Adrian, 1973; d) Adrian et al., 1969a; e) Almers et al., 1981; f) Friedrich et al., 1999.

Die zugrundeliegenden Faserparameter der Modellfaser für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Simulationen wurden als repräsentativer Mittelwert typischer einzelner Skelettmuskelzellen ermittelt und sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

<i>Parameter</i>	<i>Modellfaser</i>
Faserradius	$a = 30 \text{ } \mu\text{m}$
Faserlänge	$l = 560 \text{ } \mu\text{m}$
Temperatur	$T = 293.15 \text{ K} = 20 \text{ } ^\circ\text{C}$
TTS Eingangswiderstand	$r_s = 0 \text{ } \Omega\text{cm}^2$
Volumen des TTS bezogen auf das gesamte Faservolumen	$\rho = 0.004$
Anteil der $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit im TTS im Vergleich zur totalen $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit	$f_T = 0.999$

**Tabelle 6:** Parameter der Modellfaser zur Simulation in Abschnitt B

Im zweiten Teil (Abschnitt C, ab Seite 111) werden die Ergebnisse der *Voltage-Clamp* Experimente unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gezeigt und mit den Vorhersagen der Simulation verglichen. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den Vorhersagen des im Methodenteil vorgestellten Modells für Messungen der Calciumströme  $I_{\text{Ca}}$  in einzelnen Skelettmuskelzellen.

Konzentrationsänderungen, die zu einer Anreicherung von Ionen im TTS führen werden bei  $K^+$ -Strömen erwartet. Dieser Aspekt wird im Anschluß an den Versuche einer experimentellen Untersuchung der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderung mittels konfokaler Mikroskopie (Abschnitt D) vorgestellt.

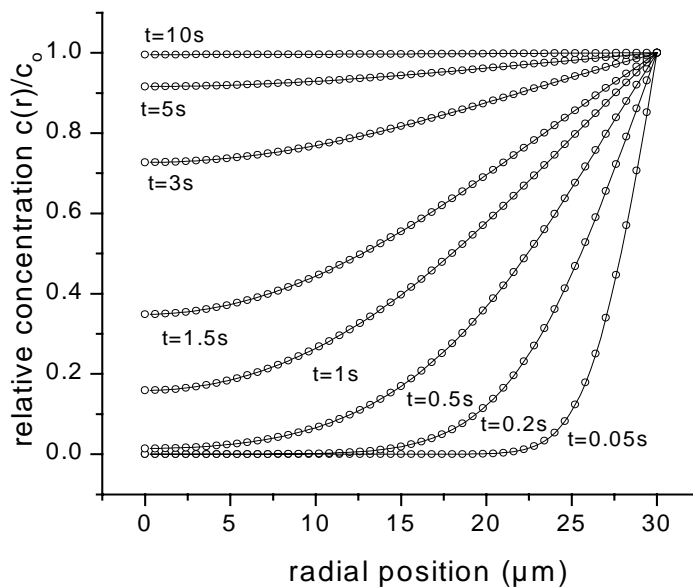
Weiterhin wird in den jeweiligen Abschnitten auch der Einfluß der intrazellulären Konzentrationsänderungen - jeweils für  $Ca^{2+}$  und  $K^+$  getrennt - untersucht und dargestellt.

Zuerst wird jedoch gezeigt, daß der Algorithmus die Kriterien hinsichtlich seiner Konvergenz und seiner Stabilität erfüllt. Dafür wurde die Lösung der zeitabhängigen Diffusionsgleichung analytisch exakt berechnet und mit den Ergebnissen der Simulation verglichen.



### A. Test des Algorithmus

Um die korrekte Ausgabe des Algorithmus zu testen, wurde der zeitliche Verlauf der radialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Eindiffusion simuliert und mit der mathematisch exakten analytischen Berechnung verglichen. Hierzu wurde die Anfangskonzentration im Inneren des TTS auf Null gesetzt. Der Algorithmus berechnet die Diffusion für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ab dem Zeitpunkt  $t = 0$  für eine Temperatur von  $20^\circ\text{C}$ . Die zeitliche Entwicklung des Konzentrationsverlaufes ist in der folgenden Abbildung zu verschiedenen Zeiten  $t$  dargestellt.



**Abbildung 27** Vergleich der Simulationsergebnisse (Symbole) mit der exakten analytischen Lösung (durchgezogene Linien) der radialen Konzentrationsverteilung  $c(r)$  im TTS für verschiedene Zeiten. Die Anfangsbedingungen sind im Text beschrieben. Faserradius  $a=30\ \mu\text{m}$ , Temperatur  $T=20^\circ\text{C}$ , effektiver Diffusionskoeffizient im TTS,  $D_{\text{Ca}} = 2.6 \times 10^{-6}\ \text{cm}^2/\text{s}$ , siehe Text.

Die Simulationsergebnisse (Symbole) stimmen mit den nach Gleichung (133) analytisch berechneten Kurven (durchgezogene Linien) bis auf einen Fehler von kleiner  $0.1\%$  überein. Die unendliche Summe in der Gleichung wurde durch die ersten 100 Terme angenähert (Uttenweiler et al., 1998).

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für eine typische Faser mit einem Faserradius von  $a = 30\ \mu\text{m}$ . Als Wert für die Diffusionskonstante für Calciumionen in extrazellulärer Lösung wurde der 1984 von Cannell *et al.* mit  $D_{\text{Ca}}^{\text{free}} = 7 \times 10^{-6}\ \text{cm}^2/\text{s}$  bestimmte Wert benutzt (Cannell und Allen, 1984). Der effektive radiale Diffusionskoeffizient wird durch zwei Faktoren redu-

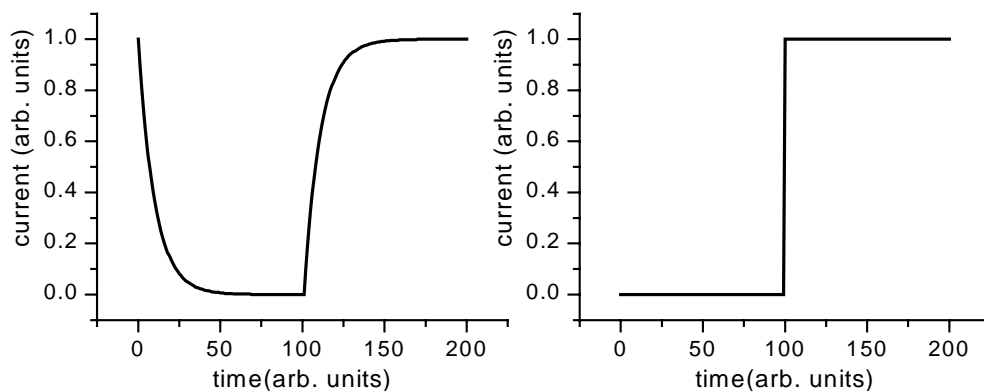
ziert (siehe METHODEN). Der verminderte Diffusionszugang (Nitsche und Balgi, 1994) ergibt einen leicht reduzierten Wert von  $D_{Ca}^{TTS} = 6.83 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  mit  $radius_{Ca^{2+}} = 0.106 \text{ nm}$  (Emsley, 1989) und  $radius_{TTS} = 25 \text{ nm}$ . Für das hier betrachtete Netzwerk mit  $\sigma = 0.375$  (Barry und Adrian, 1973) ergibt sich ein effektiver radialer Diffusionskoeffizient für  $Ca^{2+}$ -Ionen im Inneren des transversalen tubulären Systems von  $D_{Ca}^{eff} = \sigma \times D_{Ca}^{TTS} = 2.59 \times 10^{-6} \text{ nm}$ . Die Konzentration im Inneren der TTS-Scheibe bei  $r = 0$  erreicht den Wert von 99% der Außenkonzentration nach einer Zeit von ca.  $t = 7.2 \text{ s}$ .

## B. $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme -- Idealisierte Stromantworten

Im ersten Schritt wurde der Einfluß von Konzentrationsänderungen auf den Verlauf von *idealisierten Stromantworten* untersucht. Dabei handelt es sich um rein ohmsche Ströme, die als Antwort auf eine wiederum idealisierte Rechteckspannung fließen. Dabei wird angenommen, daß die Spannung im gesamten transversen tubulären System instantan anliegt und im gesamten TTS den gleichen Wert hat.

Annahme:  $\partial V_{TTS}(r)/\partial r = 0$ .

Sowohl die kapazitive Umladung der Membran als auch die prinzipiellen Beschränkungen der Spannungskontrolle (siehe GRUNDLAGEN) werden hier zunächst vernachlässigt.



**Abbildung 28:** Links: Resultierende ohmsche Stromantwort beim Anlegen einer Rechteckspannung an eine Membran. Rechts: idealisierte Antwort. Die Zeitdauer beträgt 100 willkürliche Einheiten,  $RC=10$  willkürliche Einheiten.

Als weitere Annahme wird im ersten Teil dieses Abschnitts B die Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit Null gesetzt, d.h.

Annahme:  $\partial \hat{g}(V)/\partial V = 0$ .

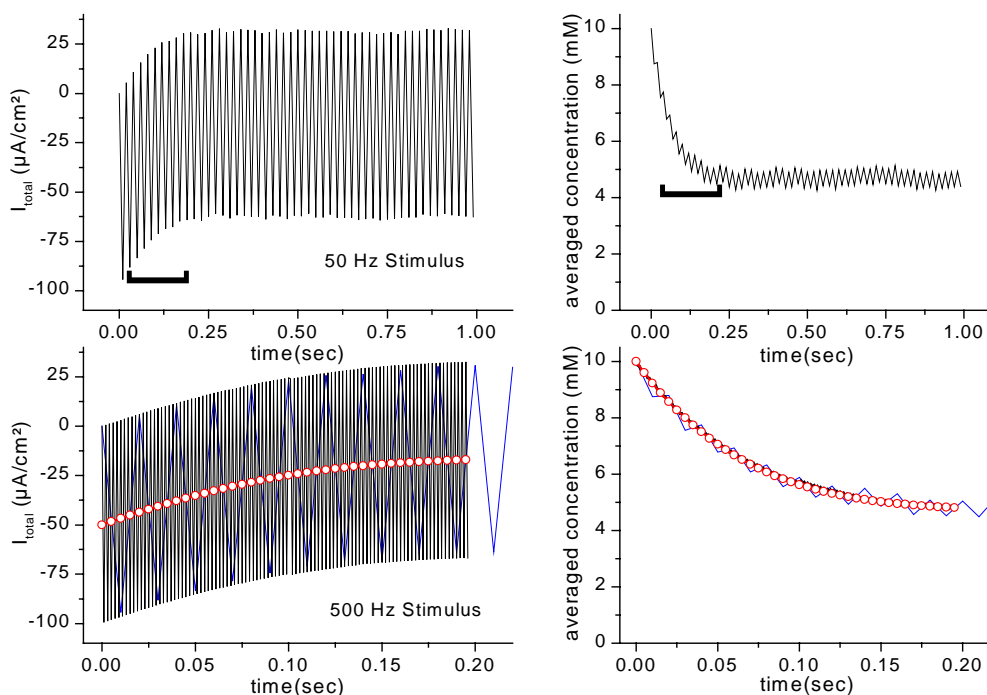
Es sei darauf hingewiesen, daß die intrinsischen Kanaleigenschaften bei den Simulationen zur Untersuchung der unterschiedlichen Faserparameter in diesem Abschnitt B noch unberücksichtigt bleiben. Die zeitabhängigen Kanaleigenschaften wie Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik werden in einer erweiterten Simulation berücksichtigt, siehe Abschnitt C, die Spannungsabhängigkeit wird in Absatz B.9 als Überleitung zu Abschnitt C eingeführt und diskutiert (siehe Seite 109).

## 1. Faserparameter

An einer repräsentativen Einzelfaser wurden in 10 mM Calciumlösung Stromdichten von typischerweise  $I_{Ca} = 100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  gemessen (Friedrich et al., 1999). Im Weiteren werden die in Tabelle 5 und Tabelle 6 angegebenen Parameter benutzt.

## 2. Konstante Spannung statt Aktionspotentiale?

Wie im Kapitel GRUNDLAGEN beschrieben wurde, wird ein Muskel *in vivo* von einer raschen Abfolge von Aktionspotentialen stimuliert. Bei genügend hoher Frequenz addieren sich die einzelnen Potentiale zu einer quasi konstanten Depolarisation. Um den Unterschied zwischen einer konstanten Depolarisation und einer Aktionspotential-Salve auf den Spannungsverlauf und den Konzentrationsverlauf zu untersuchen, wurde ein Aktionspotential durch eine Rechteckfunktion angenähert und als Spannungspuls appliziert.



**Abbildung 29:** Einfluß der Frequenz der angelegten Spannung auf den Stromverlauf.

Oben: 50 Hz Stimulus für eine Sekunde, unten 500 Hz Stimulus für 100 Millisekunden (blau) und Depolarisation mit einer konstanten Spannung mit der halben Amplitude (rote Symbole).

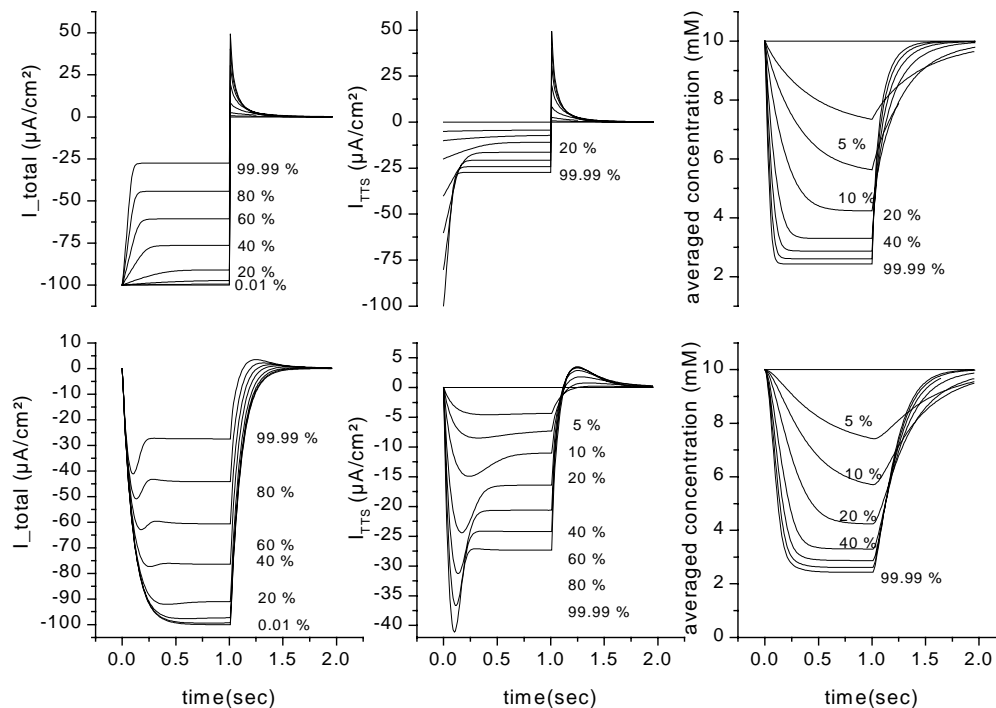
Die Abbildung zeigt oben das Ergebnis für eine Erregungsfrequenz von 50 Hz für die Zeitdauer von einer Sekunde, unten wurde für einen kleinen Zeitausschnitt (Balken, 100 Millise-

kunden) eine Frequenz von 500 Hz appliziert. Im vergrößerten Ausschnitt ist die 50 Hz-Kurve blau dargestellt.

Es wird deutlich, daß beim Anlegen einer konstanten Spannung mit der Hälfte der treibenden Kraft das gleiche Ergebnis resultiert. Rechts ist der Stromverlauf dargestellt, links die resultierende gemittelte Ionenkonzentration im TTS. Es wurden die Parameter der Modellfaser und idealisierte Stromantworten benutzt. Das Ergebnis der konstanten Spannung ist mit roten Symbolen dargestellt.

### 3. Anteil $f_T$ der TTS Leitfähigkeit an der Gesamtleitfähigkeit

Der Einfluß der Konzentrationsänderungen auf den zeitlichen Verlauf der Stromantworten ist unterschiedlich stark ausgeprägt. Ein wesentlicher Parameter ist der Anteil der TTS Leitfähigkeit im Vergleich zur gesamten Leitfähigkeit der Muskelfaser  $f_T$ . Der Anteil liegt für Kaliumionen bei ca. 66% ( $f_T=0.66$ , Eisenberg und Gage, 1965), für Calciumionen dagegen bei nahezu 100% ( $f_T=99.99\%$ , Almers et al., 1981). Die folgende Abbildung zeigt den Einfluß der Konzentrationsänderungen für unterschiedliche Werte von  $f_T$  zwischen 0.01% und 99.99%.



**Abbildung 30:** Einfluß der Konzentrationsänderung im TTS auf den zeitlichen Verlauf einer idealisierten Stromantwort (oben) und einer "realen" Stromantwort (unten) für verschiedene  $f_T$  zwischen 0.01% und 99.99%. Links: Gesamtstrom, Mitte: Strom im TTS, Rechts: resultierende räumlich gemittelte Ionenkonzentration im TTS. Zugrundeliegende Faserparameter siehe Tabelle 5 und Tabelle 6. Vergrößerte Skalierung der Abbildung unten Mitte.

Im oberen Teil der Abbildung ist der Effekt für die idealisierten Spannungspulse wiedergegeben. Die Antworten für einen "realen" Spannungspuls mit kapazitiver Umladung wird im unteren Teil dargestellt.

Dabei ist links der Gesamtstrom  $I_{total}$  und in der Mitte der Strom, der nur im TTS fließt  $I_{TTS}$  gezeigt. Rechts ist die resultierende räumlich gemittelte Ionenkonzentration im TTS abgebildet.

Wie erwartet zeigt sich mit zunehmendem Anteil der TTS-Leitfähigkeit im Vergleich zur Gesamtleitfähigkeit ein immer stärker ausgeprägter Effekt der Konzentrationsänderung. Bei  $f_T = 0.01\%$  bleibt der Strom quasi unverändert, bei  $f_T = 99.99\%$  reduziert sich der Strom bei den gegebenen Parameter auf ca. ein Viertel des Ursprungswertes (27.8%). Man beachte, daß für "reale" Spannungspulse mit großer Zeitkonstante  $\tau = RC = 100$  msec die Konzentrationsänderung den maximalen Strom um 60% reduziert, wenn der gesamte Strom im TTS fließt. Insgesamt nimmt der Strom auch hier auf einen Endwert von ca. einem Viertel des ursprünglich fließenden Stroms (27.6%) ab.

Für die im Experiment untersuchten Einzelfasern (siehe Abschnitt C, ab Seite 111) liegt die Zeitkonstante allerdings bei wesentlich geringern Werten von  $\tau = RC \cong 3$  msec. Somit kommt der idealisierte Spannungspuls der tatsächlichen Situation sehr nahe. Die Parametervariationen werden daher an idealisierten Spannungspulsen und Stromantworten durchgeführt.

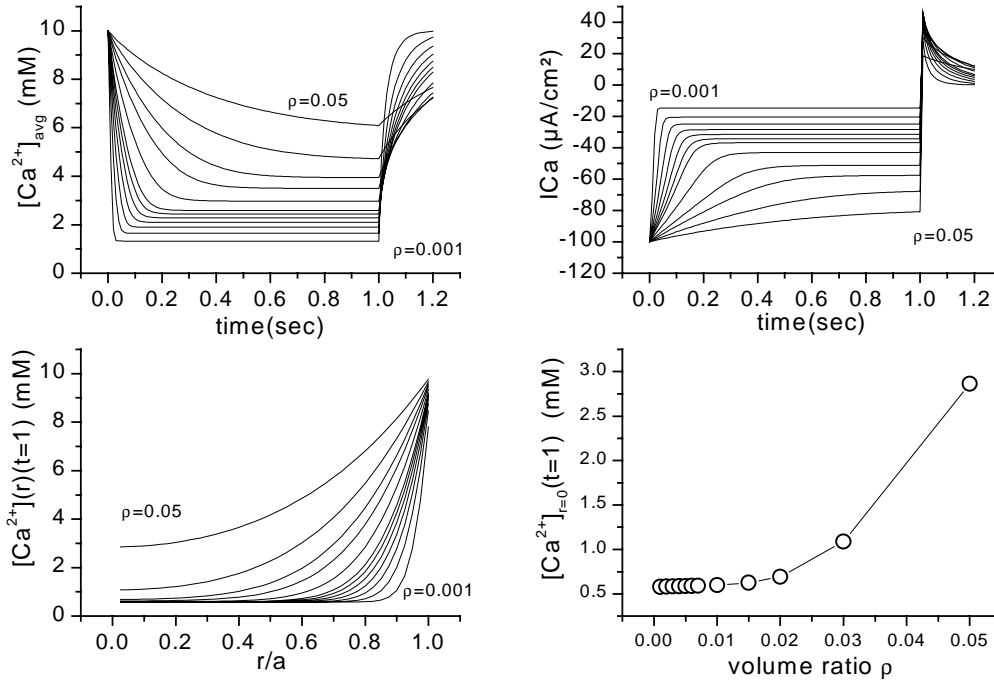
Eine weitere Interpretation des Anteils  $f_T$  bietet sich bei der Untersuchung der Kaliumströme an (siehe MATERIAL UND METHODEN). Eine genauere Untersuchung der Ströme durch den  $K_{ATP}$  Kanal bei erschöpften Froschmuskelfasern findet sich in Abschnitt E ab Seite 138)

#### **4. Bruchteil $\rho$ des TTS Volumens bezogen auf das Gesamtvolumen der Faser**

Ein weiterer Parameter, der den Effekt der Konzentrationsänderung und deren Auswirkungen auf den Stromverlauf (im Weiteren *Depletion*-Effekt genannt) stark beeinflußt ist der Anteil  $\rho$  des TTS-Volumens am gesamten Faservolumen. Bei den Simulationen wird angenommen, daß der Ionenstrom hauptsächlich durch die TTS Membran fließt. Für die untersuchten Calciumströme die durch den spannungsabhängigen Calciumkanal des Skelettmuskels (L-Type DHP-Rezeptor) fließen liegt der Anteil bei  $f_T = 99.99\%$ .

Je größer das TTS Volumen ist, desto größer ist auch das Reservoir an Ionen. Bei gleicher Membranflächenstromdichte  $I_{Ca}$  wird sich also bei größerem TTS-Volumen der *Depletion*-Effekt geringer bemerkbar machen.

In der folgenden Abbildung variiert  $\rho$  im Bereich von 0.1% bis zu 5%. Sonstige Parameter haben die Werte der Modellfaser.



**Abbildung 31:** Anteil des TTS-Volumens von  $\rho=0.1\%$  bis  $\rho=5\%$  am Gesamtvolumen der Faser. Oben: mittlere Konzentrationsverteilung (links) und dazugehörige Stromverläufe (rechts) für einen idealisierten Spannungspuls an einer Modellfaser. Unten: *steady-state*. Links Radiale Konzentrationsverteilung, rechts: resultierende Konzentration im Zentrum der Faser ( $r=0$ )

Für sehr kleine Werte von  $\rho$  fällt die räumlich gemittelte Konzentration (oben links) innerhalb von 70 msec auf ihren Endwert von 13.5% des Anfangswertes. Der Strom fällt hierbei auf Werte von  $I_{Ca}^{inf} = 14.6 \mu A/cm^2$ . Die radiale Verteilung ist unten links gezeigt. Die Eindringtiefe liegt bei ca. 2.5% des Faserradius (für die Modellfaser bei  $\lambda = 0.025 \times 30 = 0.75 \mu m$ ), d.h. nur innerhalb eines schmalen Bereichs direkt am Anfang des TTS-Schlauches kann die Konzentration durch Nachdiffusion Werte größer  $1/e$  bzw. 36.7% des Anfangswertes annehmen. Für große Werte ( $\rho > 2\%$ ) nimmt die Konzentration aufgrund der Größe des Volumens weniger stark ab. Hier liegt die Eindringtiefe für  $\rho = 0.02$  bei  $\lambda = 0.35 \times 30 = 10.5 \mu m$  und für  $\rho = 0.05$  bei  $\lambda = 0.6 \times 30 = 18 \mu m$ .

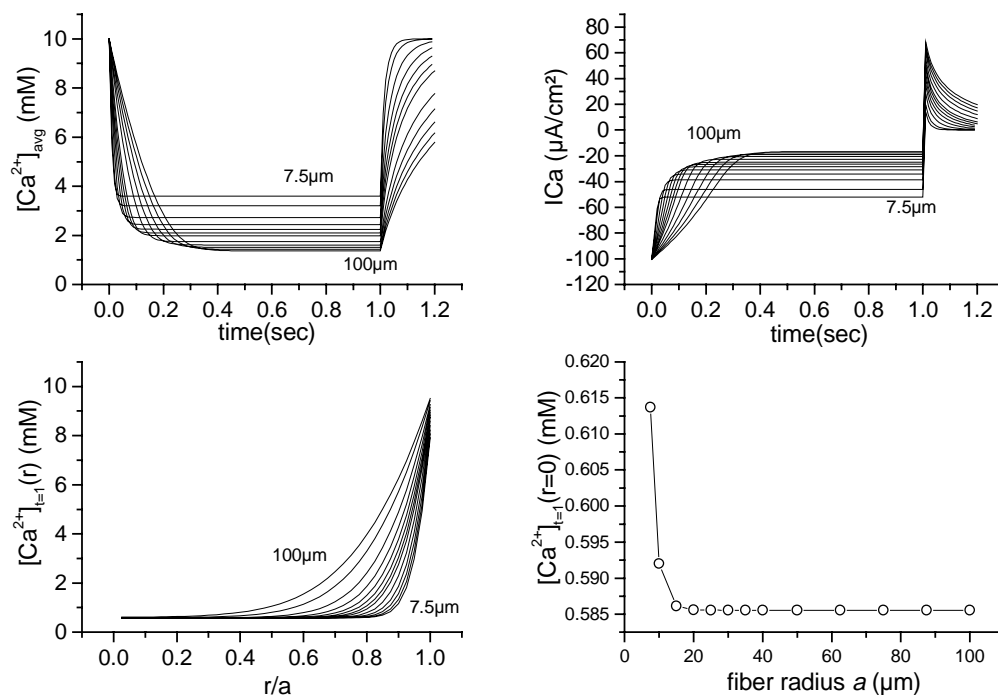
Die Abbildung zeigt unten rechts die resultierende Konzentration im Zentrum der Faser bei  $r = 0$  am Ende der Depolarisation (*steady-state*). Für kleine Werte ( $\rho < 1\%$ ) fällt die Konzentration in der Mitte der Faser bei stark depolarisierenden Spannungspulsen auf ca. 6% bis 10% der anfänglichen Konzentration, für  $\rho = 0.05$  fällt die Konzentration auf ca. ein Drittel (32.2%).

## 5. Faserradius $a$

Der Faserradius  $a$  ist ein Parameter der unterschiedlich starke Konzentrationsänderungseffekte hervorruft.

### a) Feste Stromdichte

Hier wird zuerst der Einfluß untersucht, den unterschiedliche Faserradien bei der gleichen Stromdichte hervorrufen würden. Hierbei wird angenommen, daß für jede Faser eine Messung mit einer maximalen Stromdichte von  $100\mu\text{A}/\text{cm}^2$  vorliegt. Für kleine Radien resultiert bei der gleichen Stromdichte eine effektiv höhere Leitfähigkeit durch die TTS Membran, bei größeren Radien eine geringere Flächenleitfähigkeit der TTS Membran. Die Werte variieren von  $a = 7.5\mu\text{m}$  bis  $a = 100\mu\text{m}$ . Bei den Simulationen wird jeweils eine Stromdichte von  $100\mu\text{A}/\text{cm}^2$  benutzt.



**Abbildung 32:** Einfluß des Faserradius von  $a=7.5\mu\text{m}$  bis  $a=100\mu\text{m}$  bei einer fest vorgegebenen Stromdichte. Oben: mittlere Konzentrationsverteilung (links) und dazugehörige Stromverläufe (rechts) für einen idealisierten Spannungspuls an einer Modellfaser. Unten: *steady-state*. Links: Radiale Konzentrationsverteilung rechts: resultierende Konzentration im Zentrum der Faser ( $r=0$ )



Bei einer als vom Faserradius unabhängig angenommenen, fest vorgegebenen Stromdichte nimmt die mittlere Konzentration (oben links) für Fasern mit kleinen Radien ( $a = 7.5 \mu\text{m}$ ) innerhalb von 90 msec ihren Endwert von 36% des Anfangswertes an, der Strom fällt auf einen Wert von  $I_{Ca}^{\text{inf}} = -52.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Für typische Fasern mit einem Radius von  $a = 30 \mu\text{m}$  wird die Endkonzentration von 21% der Anfangskonzentration bei 350 msec erreicht. Der Strom fällt hierbei auf einen *steady-state* Wert von  $I_{Ca}^{\text{inf}} = -28.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Für Fasern mit einem Radius von  $100 \mu\text{m}$  fällt die mittlere Konzentration bei der vorgegebenen Stromdichte erst nach 950 msec auf 13.7% des Ausgangswertes bei einem *steady-state* Strom von  $I_{Ca}^{\text{inf}} = -16.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

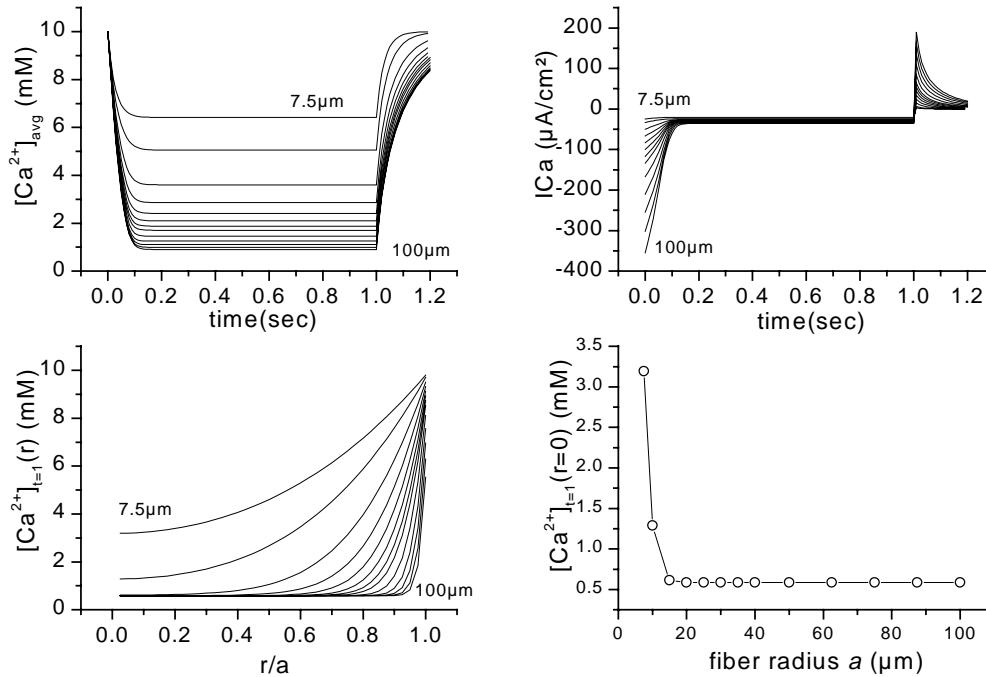
Die radiale Verteilung ist unten links gezeigt. Die Eindringtiefe liegt für einen Radius von  $a = 7.5 \mu\text{m}$  bei  $\lambda = 0.7 \mu\text{m}$ , für eine Modellfaser mit Radius  $a = 30 \mu\text{m}$  bei  $\lambda = 3 \mu\text{m}$  und für eine sehr dicke Faser mit  $a = 100 \mu\text{m}$  bei  $\lambda = 6.6 \mu\text{m}$ . nutzt.

Abbildung 32 zeigt unten rechts die resultierende Konzentration im Zentrum der Faser bei  $r = 0$  am Ende der Depolarisation (*steady-state*). Für kleine Faserradien ( $a = 7.5 \mu\text{m}$ ) fällt die Konzentration in der Mitte der Faser aufgrund der Nachdiffusion von der Faseroberfläche auf 6.13% der anfänglichen Konzentration, für Fasern mit Radien über  $a = 20 \mu\text{m}$  fällt die Konzentration auf 5.85% der anfänglichen Konzentration.

Der Effekt der Nachdiffusion am Faserrand ist deutlicher ausgeprägt, wenn nicht davon ausgegangen wird, daß bei jedem Radius eine feste Flächenstromdichte von  $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  fließt, was einer effektiv erhöhten TTS Leitfähigkeit bei kleinen Radien entspräche, die benötigt würde, um den gleichen Strom pro Fläche zu erhalten.

#### ***b) Konstante Flächenleitfähigkeit***

Im Folgenden wird der realistische Fall einer konstanten Flächenleitfähigkeit im TTS betrachtet, somit wird auch die Flächenstromdichte variieren, d.h. bei einer kleine Fläche fließt auch nur ein kleiner Strom. Den Einfluß unterschiedlicher Radien auf den *Depletion*-Effekt zeigt die folgende Abbildung.



**Abbildung 33:** Einfluß des Faserradius von  $a=7.5 \mu\text{m}$  bis  $a=100 \mu\text{m}$ , die Stromdichte variiert mit dem Radius, Annahme: gleiche Flächenleitfähigkeit im TTS.

Oben: mittlere Konzentrationsverteilung (links) und dazugehörige Stromverläufe (rechts) für einen idealisierten Spannungspuls an einer Modellfaser. Unten: *steady-state*. Links: Radiale Konzentrationsverteilung rechts: resultierende Konzentration im Zentrum der Faser ( $r=0$ )

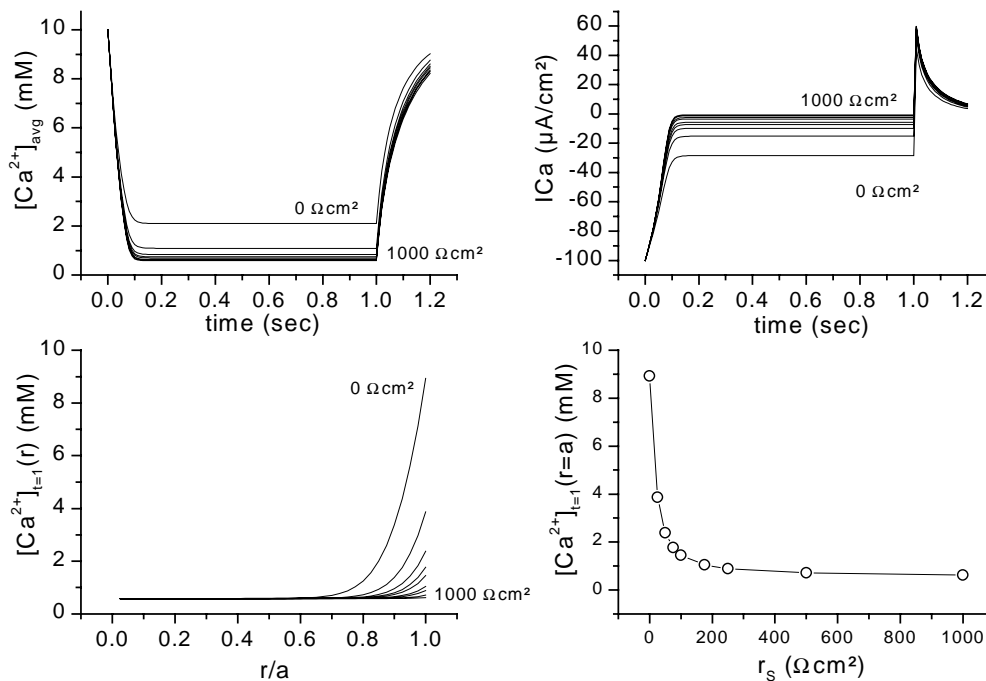
Die resultierende Konzentration im Zentrum der Faser bei  $r = 0$  am Ende der Depolarisation (*steady-state*) fällt für kleine Faserradien ( $a = 7.5 \mu\text{m}$ ) aufgrund der Nachdiffusion von der Faseroberfläche nur auf 32 % der anfänglichen Konzentration, für Fasern mit Radien über  $a = 20 \mu\text{m}$  fällt die Konzentration auf 5.5 %. Die radiale Konzentrationsverteilung ist unten links gezeigt. Die Eindringtiefe liegt für alle Radien bei  $\lambda = 5.3 \mu\text{m}$ . Dies entspricht bei Radius von  $a = 7.5 \mu\text{m}$  einer relativen Tiefe von 70% des Faserradius, für eine Modellfaser mit Radius  $a = 30 \mu\text{m}$  einer relativen Tiefe von 17.5% des Faserradius und für eine sehr dicke Faser mit  $a = 100 \mu\text{m}$  liegt die Eindringtiefe bei 5% des Faserradius.

Die räumlich gemittelte Konzentration (oben links) für Fasern mit kleinen Radien ( $a = 7.5 \mu\text{m}$ ) fällt innerhalb von 340 msec auf ihren Endwert von 64.1% des Anfangswertes, der Strom nimmt auf einen Wert von 82.7% des Anfangswertes ab ( $I_{Ca}^{\text{inf}} = -20.7 \mu\text{A/cm}^2$ ). Für typische Fasern mit einem Radius von  $a = 30 \mu\text{m}$  wird die Endkonzentration von 21% der Anfangskonzentration bei 340 msec erreicht. Der Strom fällt hierbei auf 28.4% seines Anfangswertes auf einen *steady-state* Wert von  $I_{Ca}^{\text{inf}} = -28.4 \mu\text{A/cm}^2$ . Für Fasern mit einem Radius von  $100 \mu\text{m}$  fällt die mittlere Konzentration bei der vorgegebenen Stromdichte nach

310 msec auf 9% des Ausgangswertes, der Strom erreicht nur noch 10% seines Anfangswertes ( $I_{Ca}^{inf} = -10.7 \mu A/cm^2$ ).

## 6. Eingangswiderstand $r_s$

Der Eingangswiderstand  $r_s$  beeinflusst die Nachdiffusion von Ionen aus der Badlösung in das TTS Schlauchsystem. Wie bereits beschrieben, wird der verminderte Diffusionszugang durch die Verengung an der Schlauchöffnung direkt unterhalb des Faserrandes hervorgerufen und im elektrischen Ersatzschaltbild durch den Eingangswiderstand modelliert (Barry und Adrian, 1973). Die folgende Abbildung zeigt den Einfluß von  $r_s$  auf die resultierende Konzentrationsverteilung im TTS. Oben ist die räumlich gemittelte Konzentrationsverteilung (links) und die resultierende Stromdichte (rechts) gezeigt. Die radiale Konzentrationsverteilung am Ende des depolarisierenden Spannungspulses nach 1 sec ist unten links abgebildet. Man beachte den starken Rückgang der Konzentration an der Faseroberfläche bereits für kleine Werte des Eingangswiderstandes. Im Vergleich zu den vorhergehenden Abbildungen ist unten rechts die *steady-state* Konzentration direkt unterhalb der Faseroberfläche, also bei  $r = a$  gezeigt.



**Abbildung 34:** Einfluß des Eingangswiderstandes von  $r_s=0 \Omega cm^2$  bis  $r_s=1000 \Omega cm^2$ .

Oben: mittlere Konzentrationsverteilung (rechts) und dazugehörige Stromverläufe (links) für einen idealisierten Spannungspuls an einer Modellfaser. Unten: *steady-state*. Links: Radiale Konzentrationsverteilung, rechts: resultierende Konzentration im Zentrum der Faser ( $r=0$ )

Bereits bei einem sehr kleinen Eingangswiderstand von  $r_s = 25 \Omega\text{cm}^2$  zeigt sich eine starke Abnahme der Konzentration direkt unterhalb der Faseroberfläche an der Öffnung des TTS Schlauches zur Badlösung. Hier fällt die Konzentration bereits auf einen Wert von kleiner 40% der Anfangskonzentration. Für die im Experiment untersuchten Fasern lag der Eingangswiderstand im Bereich von  $r_s \approx 50..100 \Omega\text{cm}^2$ , dort macht sich der Einfluß von  $r_s$  noch stärker bemerkbar.

Die *steady-state* Werte für die räumlich gemittelte Konzentration  $[Ca^{2+}]_{avg}$ , die Stromdichte  $I_{Ca}$ , die Zeit  $t$  zum Erreichen des stationären Zustands, die Konzentration  $[Ca^{2+}]_{r=a}^{t=1}$  direkt unterhalb der Faser bei  $r = a$  sowie die Konzentration  $[Ca^{2+}]_{r=0}^{t=1}$  im Inneren der TTS-Scheibe bei  $r = 0$  sind in der folgenden Tabelle für unterschiedliche Werte von  $r_s$  zusammengefasst. Man beachte, daß die Konzentration  $[Ca^{2+}]_{r=0}^{t=1}$  im Inneren des TTS im stationären Zustand quasi nicht vom Eingangswiderstand abhängt.

$r_s$ ( $\Omega\text{cm}^2$ )	$[Ca^{2+}]_{avg}$ (mM)	$I_{Ca}(t=1)$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	Time $t$ (msec)	$[Ca^{2+}]_{r=a}^{t=1}$ (mM)	$[Ca^{2+}]_{r=0}^{t=1}$ (mM)
0	2.10	-28.4	320	8.93	0.585
25	1.09	-15.1	310	3.87	0.585
100	0.70	-5.7	260	1.45	0.585
1000	0.59	-0.72	250	0.62	0.585

**Tabelle 7:** Mittlere Konzentration, Stromdichte, Konzentration bei  $r=a$  und  $r=0$  im *steady-state* für unterschiedliche Werte des Eingangswiderstands  $r_s$ .

Für typische Werte des Eingangswiderstands im Bereich von ca.  $50 \Omega\text{cm}^2$  bis  $100 \Omega\text{cm}^2$  (siehe DISKUSSION) fällt die mittlere Konzentration auf ca. 15% des Ruhewertes, der Strom fällt im stationären Zustand auf einen Wert von etwas über 5% der Anfangsstromdichte. Bei einem großen Eingangswiderstand von  $r_s = 1000 \Omega\text{cm}^2$  fließt im stationären Zustand nur noch ein sehr kleiner Strom von weniger als 1% der ursprünglichen Stromdichte.

## 7. Extrazelluläre Ionenkonzentration

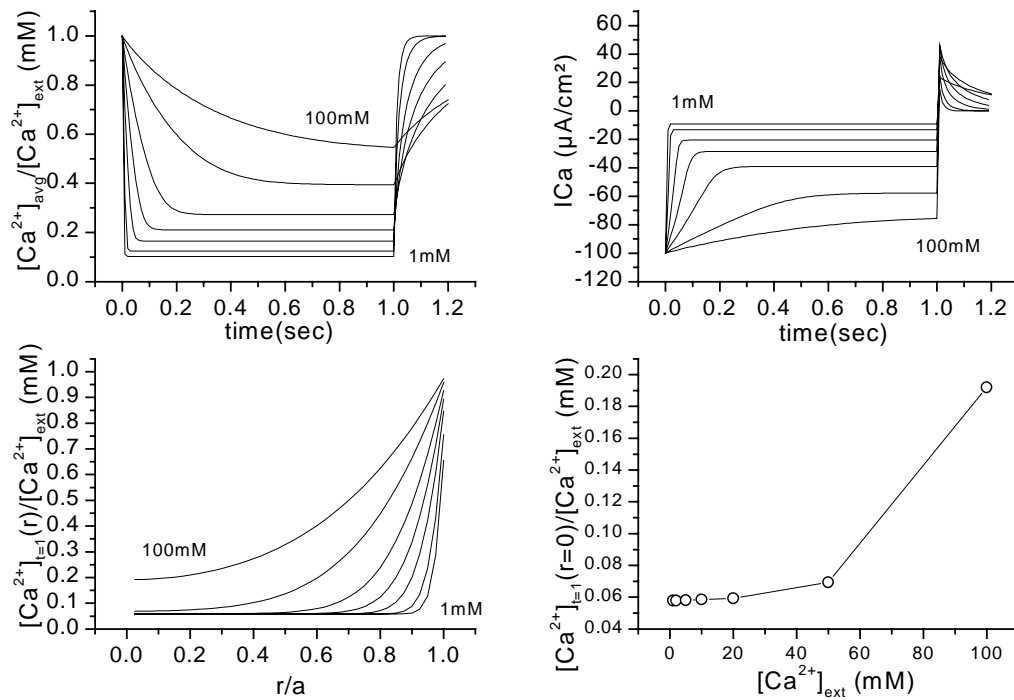
Bei der Untersuchung von  $Ca^{2+}$ -Strömen hat die extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration einen direkten Einfluß auf die Ladungsträgerzahl und somit auch auf die Amplitude des  $Ca^{2+}$ -Stroms. Bei der Untersuchung von Kaliumströmen wird ein anderer Effekt vermutet. Hier ist die An-

zahl der Ladungsträger nicht von der extrazellulären Konzentration abhängig, da es sich um einen Ausstrom aus dem Faserinneren in das TTS handelt. Der Einfluß der extrazellulären Kaliumkonzentration auf den Stromverlauf wird gesondert in Abschnitt E.9 (Seite 146) untersucht.

In einem ersten Schritt wurde die Ionenkonzentration verändert, ohne den Einfluß der Ladungsträgerdichte auf die maximale Stromdichte zu berücksichtigen. Es wird also, wie bei der Variation des Faserradius, zuerst von einer maximalen Stromdichte von  $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ausgegangen, die unabhängig von der extrazellulären Konzentration fließen soll.

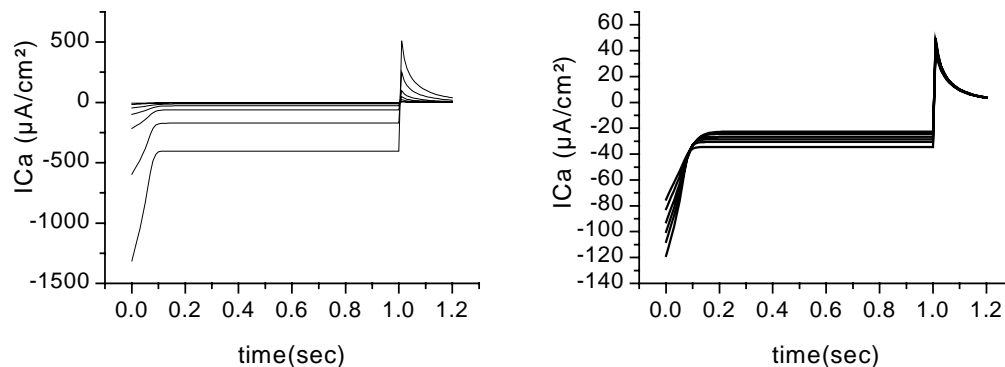
Dies entspräche bei einer 10fach erniedrigten Anfangskonzentration einer effektiven 10fachen Erhöhung der Leitfähigkeit. In diesem ersten Schritt soll gezeigt werden, daß die Variation der Ionenkonzentration bei sonst unveränderten Bedingungen (maximale Stromdichte) zu einer falschen Interpretation des *Depletion Effekts* führen kann. So resultieren bei einer 10fach erhöhten Ionenkonzentration (100 mM) und gleicher Stromdichte ( $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), also einer effektiv um den Faktor 10 erniedrigten Leitfähigkeit der TTS-Membran, folgende Werte: Die mittlere Konzentration fällt auf einen Wert von 54.6% des Ursprungswertes, der Strom fällt auf 75% des Anfangswertes. Die Konzentration bei  $r = 0$  erreicht noch 19% der Anfangskonzentration, die Eindringtiefe für eine  $30 \mu\text{m}$  breite Faser liegt bei  $\lambda = 13 \mu\text{m}$ . Insgesamt fällt der Effekt aufgrund der effektiv erniedrigten Leitfähigkeit erwartungsgemäß schwach aus.

Bei einer 10fach erniedrigten Konzentration (1mM) und gleicher Stromdichte ( $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), also einer effektiv um den Faktor 10 erhöhten Leitfähigkeit der TTS-Membran ergibt sich Folgendes: Die mittlere Konzentration fällt auf einen Wert von 10.3% des Ursprungswertes, der Strom fällt auf 9.2% des Anfangswertes. Die Konzentration bei  $r = 0$  erreicht 5.8% der Anfangskonzentration, die Eindringtiefe für eine  $30 \mu\text{m}$  breite Faser liegt bei  $\lambda < 0.5 \mu\text{m}$ . Hier fällt der Effekt aufgrund der relativ erhöhten TTS-Leitfähigkeit erwartungsgemäß stark aus.



**Abbildung 35:** Einfluß der initialen Ionenkonzentration von  $[Ca^{2+}]_{ext}=1$  mM bis  $[Ca^{2+}]_{ext}$  100 mM. Vereinfachte Annahme: Keine Auswirkung auf die Stromdichte  $I_{Ca}$  und auf das Gleichgewichtspotential  $E_{Ca}$ . Oben: mittlere Konzentrationsverteilung (rechts) und dazugehörige Stromverläufe (links) für einen idealisierten Spannungspuls an einer Modellfaser. Unten: *steady-state*. Links: Radiale Konzentrationsverteilung, rechts: resultierende Konzentration im Zentrum der Faser ( $r=0$ )

Bei einer unveränderten TTS-Leitfähigkeit bestimmt die Anzahl der Ladungsträger (d.h. die Ionenkonzentration) auch die Amplitude der Stromdichte. Dies ist in der folgenden Abbildung links dargestellt. Zum Vergleich ist rechts die Stromdichte auf eine Ladungsträgerdichte von 10 mM normiert dargestellt.



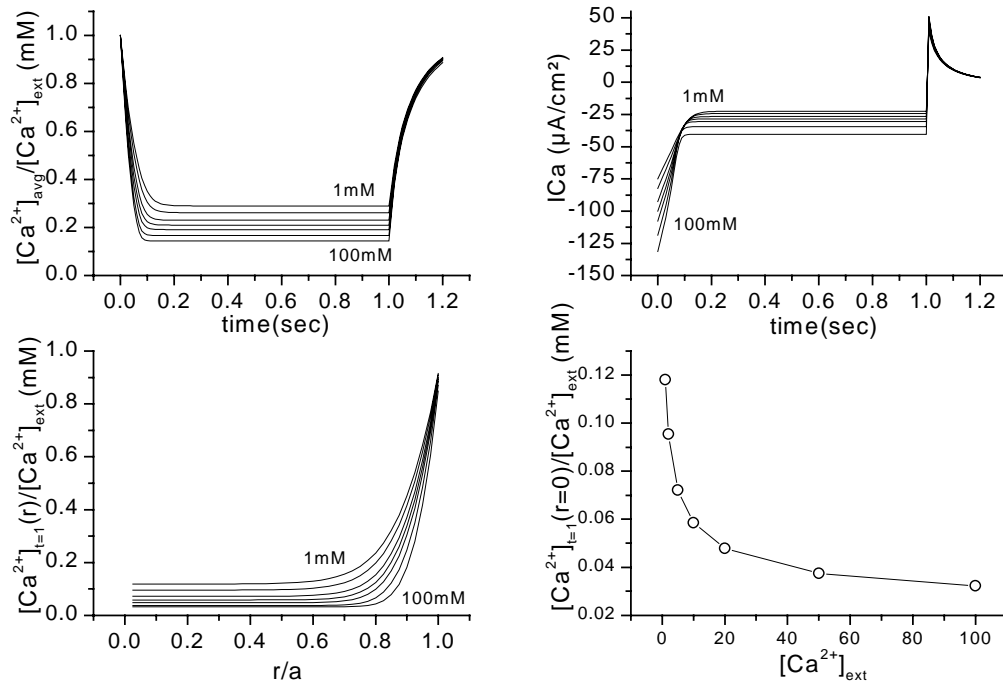
**Abbildung 36:** Stromdichte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ladungsträger und des veränderten Gleichgewichtspotentials  $E_{Ca}$ .

Links: Absolutwerte der Stromdichte (in  $\mu A/cm^2$ ), Rechts: normiert auf eine Ladungsträgerdichte einer 10 mM Konzentration.

Im Gegensatz zu den in Abbildung 35 dargestellten Ergebnissen zeigt Abbildung 37 einen anderen Einfluß der initialen Konzentration auf den Konzentrationsverlauf der betrachteten Modellfaser. Hier ergeben sich für eine 10fach erhöhte Anfangskonzentration (100 mM) folgende Werte: die mittlere Konzentration liegt bei 11.35% der Anfangskonzentration, die Konzentration in der Fasermittte liegt bei 3.2% der Anfangskonzentration, die Eindringtiefe beträgt  $\lambda = 1.5 \mu m$ .

Bei einer 1 mM Anfangskonzentration resultiert eine mittlere Konzentration von 29% der Anfangskonzentration, die Konzentration in der Mitte des TTS fällt auf 11.8% der Anfangskonzentration und die Eindringtiefe liegt bei  $\lambda = 3.7 \mu m$ .

Die Stromdichte fällt bei allen Anfangskonzentrationen auf 30% ihrer Anfangsamplitude. Man beachte, daß die Stromdichten auf die Ladungsträgerdichte einer 10 mM Badlösung normiert sind. Die unterschiedlichen Amplituden resultieren aus der konzentrationsabhängigen *driving force* gemäß der Nernst Gleichung (siehe Seite II.A.6)



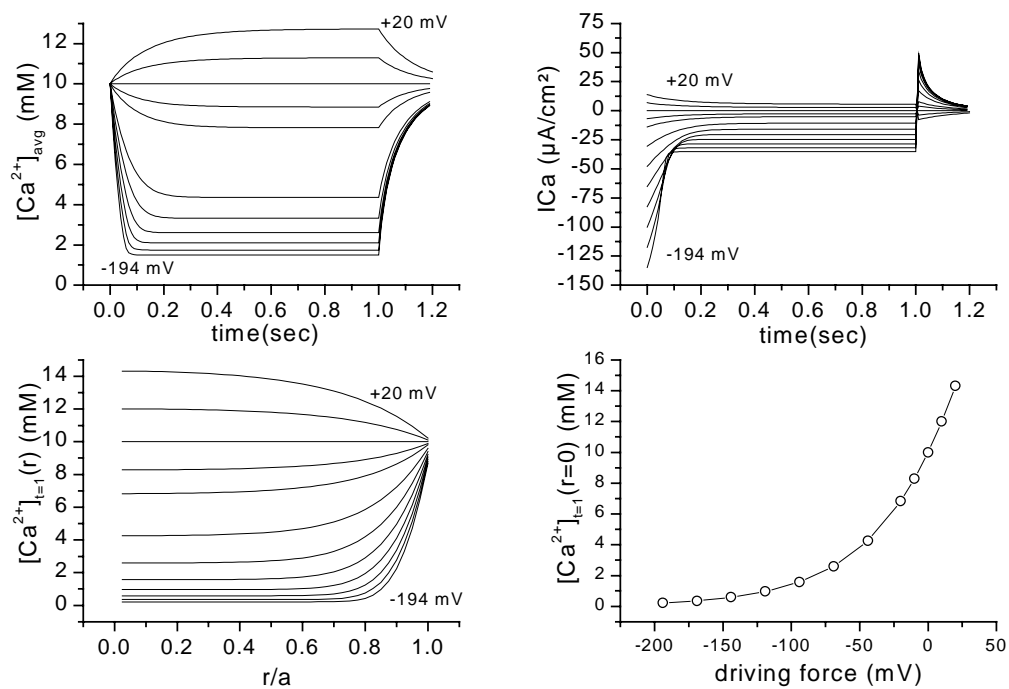
**Abbildung 37:** Einfluß der initialen Ionenkonzentration von  $[Ca^{2+}]_{ext}=1$  mM bis  $[Ca^{2+}]_{ext}$  100 mM unter Berücksichtigung der Auswirkung auf die Amplitude der maximalen Stromdichte  $I_{Ca}$  und auf das Gleichgewichtspotential  $E_{Ca}$ .

Oben: mittlere Konzentrationsverteilung (rechts) und dazugehörige Stromverläufe (links) für einen idealisierten Spannungspuls an einer Modellfaser (normiert auf eine 10 mM Ladungsträgerdichte). Unten: *steady-state*. Links: Radiale Konzentrationsverteilung, rechts: resultierende Konzentration im Zentrum der Faser ( $r=0$ )



## 8. Kommando-Potential $V_{\text{clamp}}$

Zur Untersuchung des Einflusses der treibenden Kraft (*driving force*) auf den Konzentrationsverlauf wurde die angelegte Spannung  $V_{\text{clamp}}$  im Bereich von -50 mV bis +164 mV variiert, für ein Gleichgewichtspotential von  $E_{\text{rest}} = +144$  mV resultiert somit eine treibende Kraft im Bereich von -194 mV bis +20 mV. Für eine von der Spannung unabhängige, konstante Leitfähigkeit ergibt sich beim Anlegen eines kompletten Pulsprotokolls folgender Einfluß auf die Konzentration und auf den Stromverlauf.

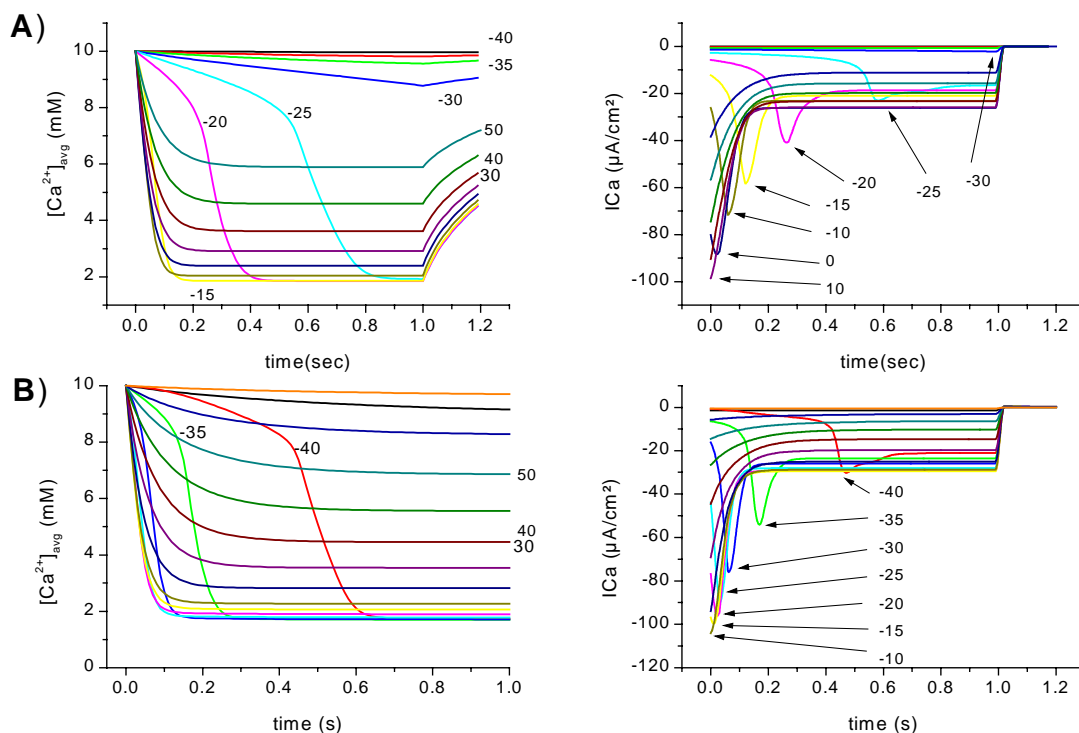


**Abbildung 38:** Einfluß der *driving force*  $V_{\text{clamp}} - E_{\text{rest}}$  von +20 mV bis -194 mV. Konstante Leitfähigkeit  
 Oben: mittlere Konzentrationsverteilung (rechts) und dazugehörige Stromverläufe (links) für einen idealisierten Spannungspuls an einer Modellfaser. Unten: *steady-state*. Links: Radiale Konzentrationsverteilung, rechts: resultierende Konzentration im Zentrum der Faser ( $r=0$ ).

## 9. Spannungsabhängige Leitfähigkeit

Im Allgemeinen besitzen Ionenleitfähigkeiten auch eine Spannungsabhängigkeit, die bisher nicht berücksichtigt wurde. Für den untersuchten spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (L-Type DHP-Rezeptor) gibt es unterschiedliche Modelle. Das Modell von Jafri *et al.* (1998) basiert auf der Öffnungswahrscheinlichkeit eines Einzelkanals am Herzmuskel. In einem anderen Modell benutzen Dietze *et al.* (1998) eine Boltzmannfunktion um die Spannungsabhängigkeit des L-Type  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms von Skelett Myotuben makroskopisch zu beschreiben, ebenso wie Wang *et al.* (1999) zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit bei ausdifferenzierten Skelettmuskelfasern.

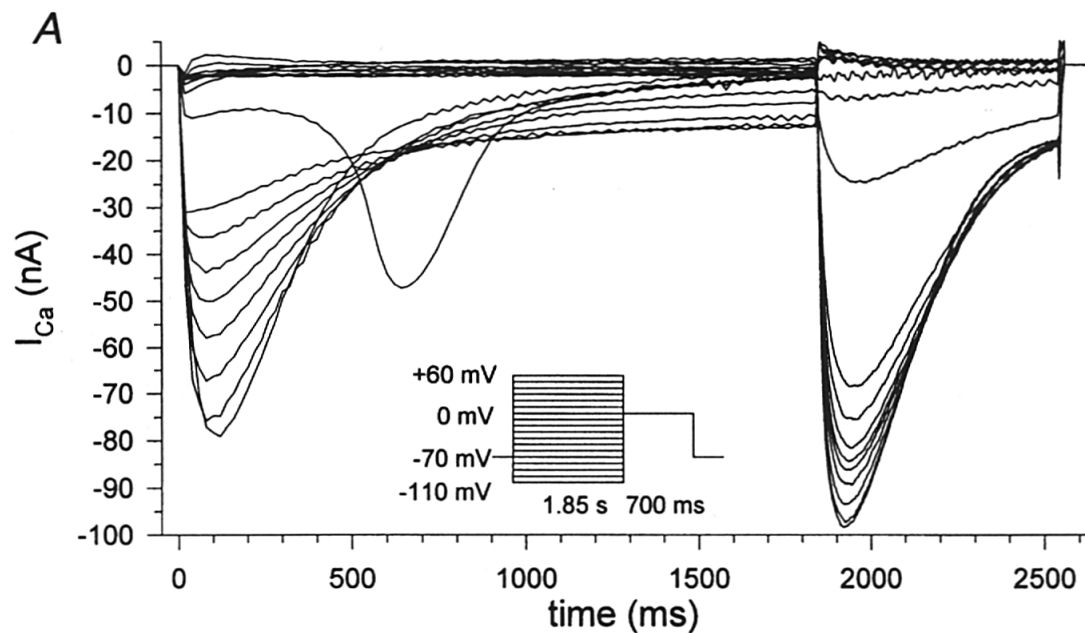
Der Einfluß Spannungsabhängigkeit wird in der folgenden Abbildung gezeigt, der Bereich des angelegten Kommando-Potentials liegt bei Werten von  $V_{\text{clamp}} = -50 \text{ mV}$  bis  $V_{\text{clamp}} = +75 \text{ mV}$ .



**Abbildung 39:** Einfluß der driving force  $V_{\text{clamp}} - E_{\text{rest}}$  für Spannungen  $V_{\text{clamp}}$  von  $-50 \text{ mV}$  bis  $+75 \text{ mV}$  auf die mittlere Konzentration (links) und den Stromverlauf (rechts) für unterschiedliche Spannungsabhängigkeiten der Leitfähigkeit.

A) Cardiac L-Type DHP receptor, Modell von Jafri *et al.* (1998), B) Skeletal Myotubes, Modell von Dietze *et al.* (1997) oder Wang *et al.* (1999)

Für Membranpotentiale zwischen  $-40$  mV und  $0$  mV tritt ein bemerkenswertes Verhalten auf. Durch die Konzentrationsänderung kommt die treibende Kraft in einen positiveren Bereich in dem die Leitfähigkeit bei abnehmender *driving force* ansteigt. Dieser Anstieg führt konsequenterweise zu einem größeren Strom aus dem TTS ins Faserinnere und somit zu einer stärkeren Konzentrationsänderung, die den Effekt wiederum verstärkt. Wenn die treibende Kraft weiter abnimmt, fällt auch die Leitfähigkeit wieder unter ihren maximalen Wert. Dieser Verlauf des Membranstroms wurde auch im Experiment bei einer Messung an kontrahierenden Fasern beobachtet. Die folgende Abbildung stammt aus der Publikation von Friedrich, Ehmer & Fink, 1999. Man beachte daß hier der absolute Strom dargestellt ist, nicht die Membranstromdichte.



**Abbildung 40:** Experimentelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme, verspätete Aktivierung durch Konzentrationsänderungen an einer Einzelfaser in Hypertoner Lösung, Länge 595  $\mu\text{m}$ , Radius 21  $\mu\text{m}$  (nach Fig. 11A Friedrich et al., 1999)).

### **C. $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme -- Experimentelle Meßwerte als Simulations-Input**

Im nächsten Schritt wurde das Programm zur Berechnung des *Depletion* Effekts erweitert, um vorgegebene Meßwerte  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$  einlesen zu können. Der untere Index gibt an, ob es sich um experimentell aufgenommene Meßwerte (*exp*) handelt, oder um Werte die in der Simulation berechnet wurden (*sim*). Der obere Index zeigt, ob eine Konzentrationsänderung auftreten kann (*unbuff*) oder ob sie experimentell verhindert wurde (*buff*). Die eingelesenen experimentell aufgenommenen Meßwerte wurden dann als Ausgangswerte in der Simulationen verarbeitet. Die genaue Vorgehensweise wird im Kapitel MATERIAL UND METHODEN beschrieben.

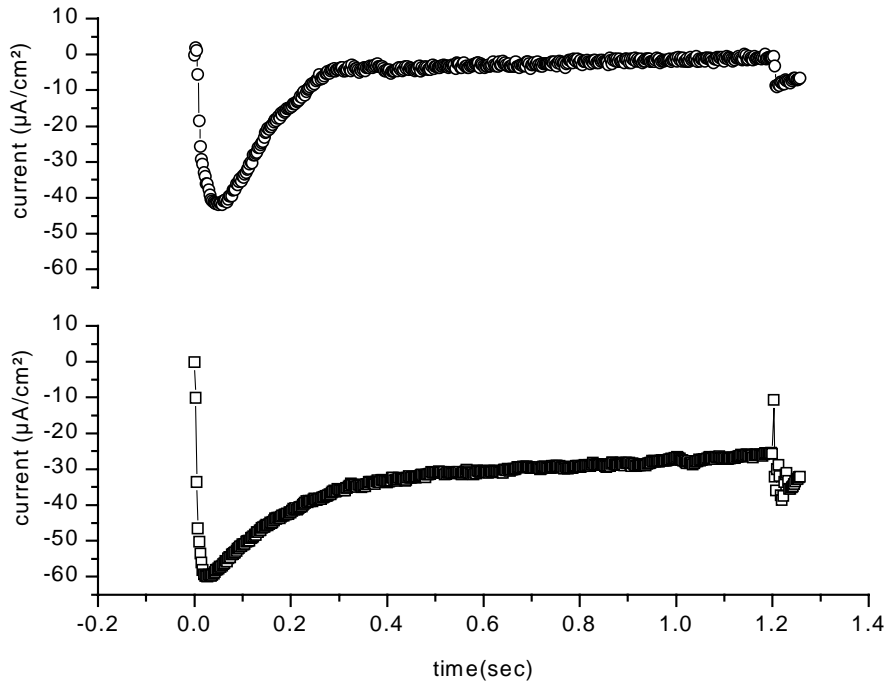
In diesem Unterkapitel wird die Verarmung der Ionenkonzentration untersucht, wie sie bei einem Einstrom aus dem TTS in die Faser auftritt. Hierzu eignet sich die Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrome (siehe auch DISKUSSION).

Dieser Abschnitt zeigt den Einfluß der Konzentrationsänderung auf den zeitlichen Verlauf der eingelesenen Ströme. Gleichzeitig werden auch wieder die resultierenden berechneten Ionenkonzentrationen im TTS dargestellt. An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, daß die direkte experimentelle Beobachtung solcher Konzentrationsänderungen aufgrund der mikroskopischen Ausmessungen des betrachteten Systems bisher nicht möglich ist (Kim und Vergara, 1998; Zoghbi et al., 2000). Erste qualitative Voruntersuchungen wurden bereits durchgeführt, die Ergebnisse werden zusammen mit den experimentellen Grenzen in Abschnitt D behandelt.

Die in diesem Abschnitt C betrachteten experimentellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme wurden bei Messungen einer kontrahierenden Einzelfaser des *M. interosseus* einer BALB/c Maus aufgenommen. Die Präparation sowie die Zusammensetzung der Badlösungen ist im Kapitel MATERIAL UND METHODEN beschrieben.

Die nächste Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms  $I_{\text{exp}}^{\text{unbuff}}(t)$  einer typischen Messung in ungepufferter Lösung (Kreise) im Vergleich zu einer Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$  an der selben Faser in gepufferter Lösung (Quadrate) für einen Spannungspuls auf ein Membranpotential von 0 mV.

Der aufgenommene Strom ist ein reiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom, da einerseits sonstige Ionenströme bzw. die Leitfähigkeiten der anderen Ionenkanäle ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) mit Kanalblockern unterdrückt wurden, und andererseits die Lösung quasi keine  $\text{Cl}^-$  Ionen enthält. Die Faserdimensionen der untersuchten Faser sind in der Legende zu Abbildung 41 beschrieben.

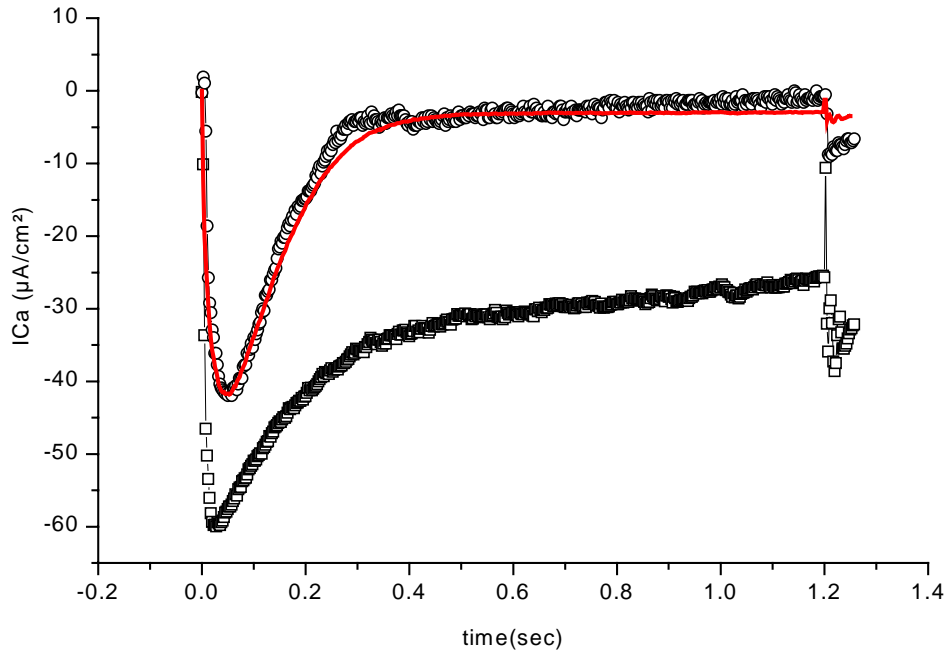


**Abbildung 41:** Typischer Stromverlauf bei einer Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme einer Einzelfaser des *M. interosseus* Einzelfaser in ungepufferter (Kreise, oben) und in gepufferter (Quadrate, unten) 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung bei 23°C. Faserdimensionen: Radius  $a=35\text{ }\mu\text{m}$ , Länge  $l=650\text{ }\mu\text{m}$ . Kommando-Potential  $V_{\text{clamp}}=0\text{ mV}$ .

Die wesentlich schnellere Inaktivierungskinetik von  $I_{\text{exp}}^{\text{unbuff}}(t)$  mit einer Zeitkonstante von  $\tau_{\text{exp}}^{\text{unbuff}} = 72 \pm 3\text{ msec}$  im Vergleich zu  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$  mit  $\tau_{\text{exp}}^{\text{buff}} = 208 \pm 4\text{ msec}$  wurde durch die Simulation reproduziert. Dazu wurde der experimentell in gepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung aufgenommene Strom  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$  als Input für die numerische Simulation benutzt, um den Effekt der Konzentrationsänderungen auf die zeitliche Entwicklung zu berechnen.

## 1. Vergleich der Simulations-Ausgabe mit experimentellen Meßwerten

Abbildung 42 zeigt den Input-Strom  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$  (offene Quadrate) zusammen mit dem berechneten Simulations- Output  $I_{\text{sim}}^{\text{unbuff}}(t)$  (rote Linie) im Vergleich mit der Messung in ungepufferter Lösung  $I_{\text{exp}}^{\text{unbuff}}(t)$  (offene Kreise) gezeigt. Die Zeitkonstante für  $I_{\text{sim}}^{\text{unbuff}}(t)$  liegt bei  $\tau_{\text{sim}}^{\text{unbuff}} = 78 \pm 3$ . Die Zeitdauer  $t$  der Depolarisation betrug 1.2 Sekunden.

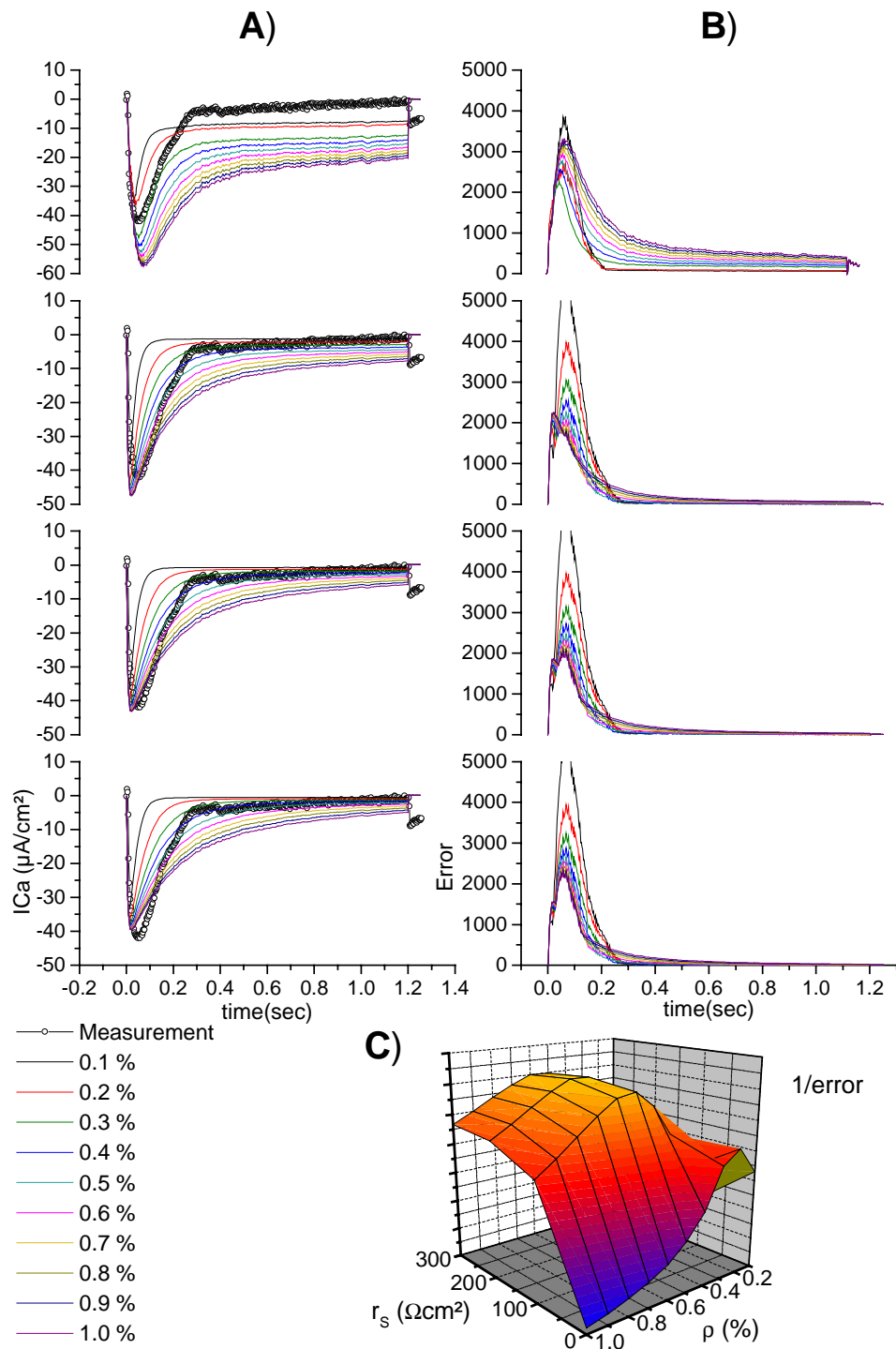


**Abbildung 42:** Simulations-Input  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$  (Quadrate), Output  $I_{\text{sim}}^{\text{unbuff}}(t)$  (rote Linie) und Vergleich mit der Messung  $I_{\text{exp}}^{\text{unbuff}}(t)$  (Kreise) in ungepufferten 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung bei 23°C.

Faserdimensionen: Radius  $a=35 \mu\text{m}$ , Länge  $l=650 \mu\text{m}$ . Kommando-Potential  $V_{\text{clamp}}=0 \text{ mV}$ .

Um eine Übereinstimmung des Simulations-Outputs mit der Messung in ungepufferten Lösung zu erreichen, wurde der Eingangswiderstand auf einen Wert von  $r_s=200 \Omega\text{cm}^2$  gesetzt, der Volumenanteil des TTS am Fasergesamtvolumen wurde mit  $\rho=0.004$  ermittelt. Das Wertepaar  $(r_s=200, \rho=0.004)$  der beiden Faserparameter hat sich aus einem Parameter-raum von  $\Pi = R \times P$  mit  $\|R\|=1100$  und  $\|P\|=200$  (entspricht 220.000 Kombinationen) als *Best-Fit* herausgestellt (siehe auch MATERIAL UND METHODEN, Seite 83).

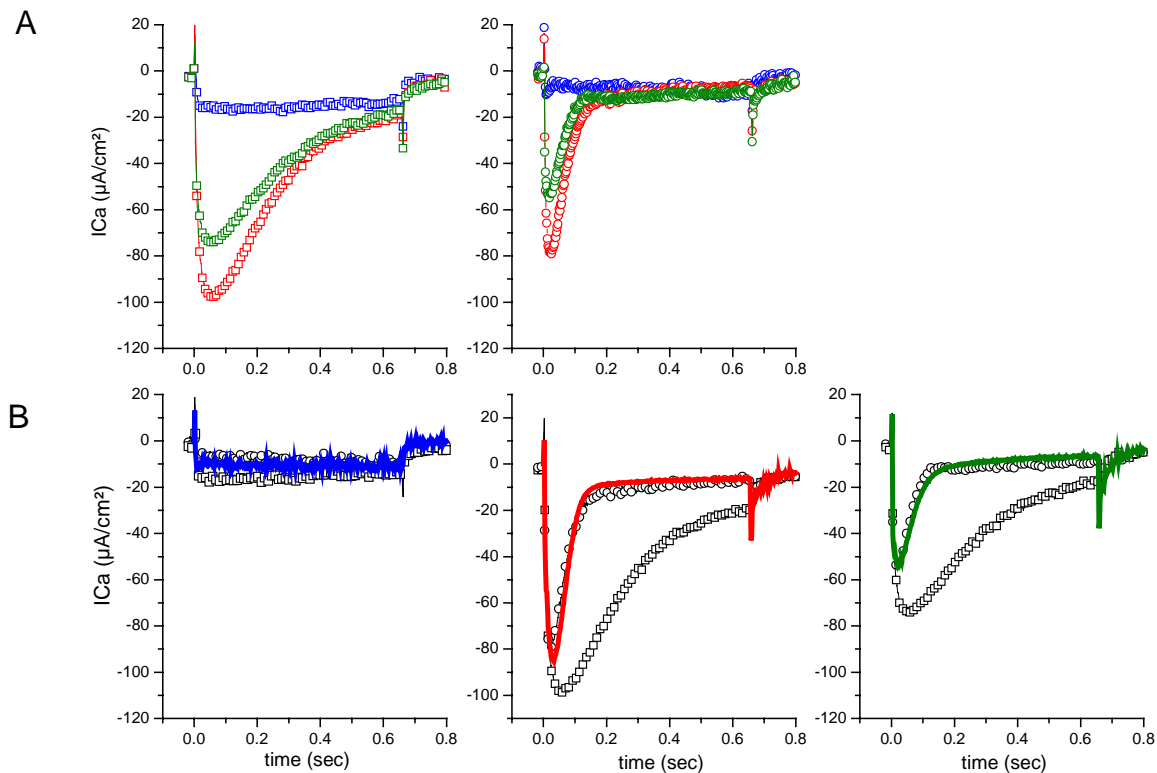
In Abbildung 43 ist das Verfahren zur Bestimmung des *Best Fit* für 10 Werte von  $\rho$  (zwischen 0.1% und 1% mit einem 0.1% Inkrement) und für 4 Werte von  $r_s$  (zwischen  $0 \Omega\text{cm}^2$  und  $300 \Omega\text{cm}^2$  mit einem Inkrement von  $100 \Omega\text{cm}^2$ ) dargestellt. In A) sind die simulierten Ströme gezeigt, in B) der Quadratische Fehler und in C) der Kehrwert der Summe über die Quadratischen Fehler.



**Abbildung 43:** Bestimmung der Simulationsparameter aus dem Wertebereich. 10 Schritte für  $\rho$ , 4 Schritte für  $r_s$ . A) Zeitverlauf der Ströme, B) Mittlerer quadratischer Fehler C) Parametervergleich (1/Fehler).

Um ein Pulsprotokoll mit mehr als einer angelegten Spannung zu untersuchen, mußte die Pulsdauer verkürzt werden, da die Fasern einen Lösungswechsel sonst nicht überlebten

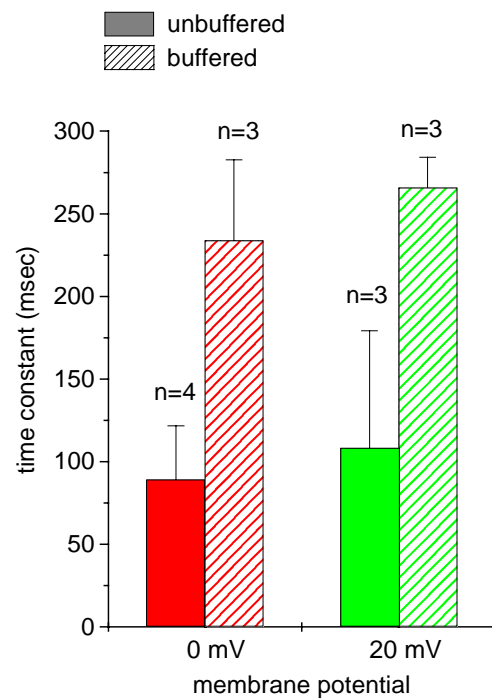
(Friedrich et al., 1999). Es hat sich gezeigt, daß eine erhöhte Temperatur die Überlebenswahrscheinlichkeit beim Lösungswechsel vergrößerte. In Abbildung 44 wird eine weitere Faser gezeigt, bei der Spannungspulse von  $-20$  mV (blau),  $0$  mV (rot) und  $+20$  mV (grün) appliziert wurden. In A) sind die Messungen bei  $29.7^\circ\text{C}$  in gepufferter Lösung (offene Quadrate, links) und die dazugehörigen Messungen in ungepufferter Lösung (offene Kreise, rechts) dargestellt. Die Zeitkonstanten sind in der Legende und in Tabelle 8 zusammen mit den Faserparametern (Länge, Radius, Eingangswiderstand und Volumenanteil des TTS) beschrieben. In Abbildung 44B) wird für jede Spannung noch einmal der Strom in gepufferter Lösung  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$  (offene Quadrate) und die resultierende Simulation  $I_{\text{sim}}^{\text{unbuff}}(t)$  (Linien,  $-20$  mV blau,  $0$  mV rot,  $+20$  mV grün) im Vergleich mit den Messungen in ungepufferter Lösung  $I_{\text{exp}}^{\text{unbuff}}(t)$  (offene Kreise) separat gezeigt.



**Abbildung 44** Messung und Simulation einer repräsentativen Einzelfaser bei  $30^\circ\text{C}$ . Faserparameter: Radius  $a=24\ \mu\text{m}$ , Länge  $l=640\ \mu\text{m}$ . Eingangswiderstand  $r_s=120\text{-}30\ \Omega\text{cm}^2$ ,  $\rho=0.007\text{-}0.0055$ . (Faser f22o99). Zeitliche Entwicklung der experimentellen Ströme in gepufferter Lösung (Quadrate, links) bei  $-20$  mV (schwarz),  $0$  mV (rot) und  $+20$  mV (grün) und in ungepufferter Lösung (Kreise, rechts). B) Vergleich von Messung und Simulation (Linie) für jedes Kommando-Potential ( $-20$  mV links,  $0$  mV mitte und  $+20$  mV rechts). Hier wurde wiederum der gepufferte Strom als Simulationsinput benutzt.

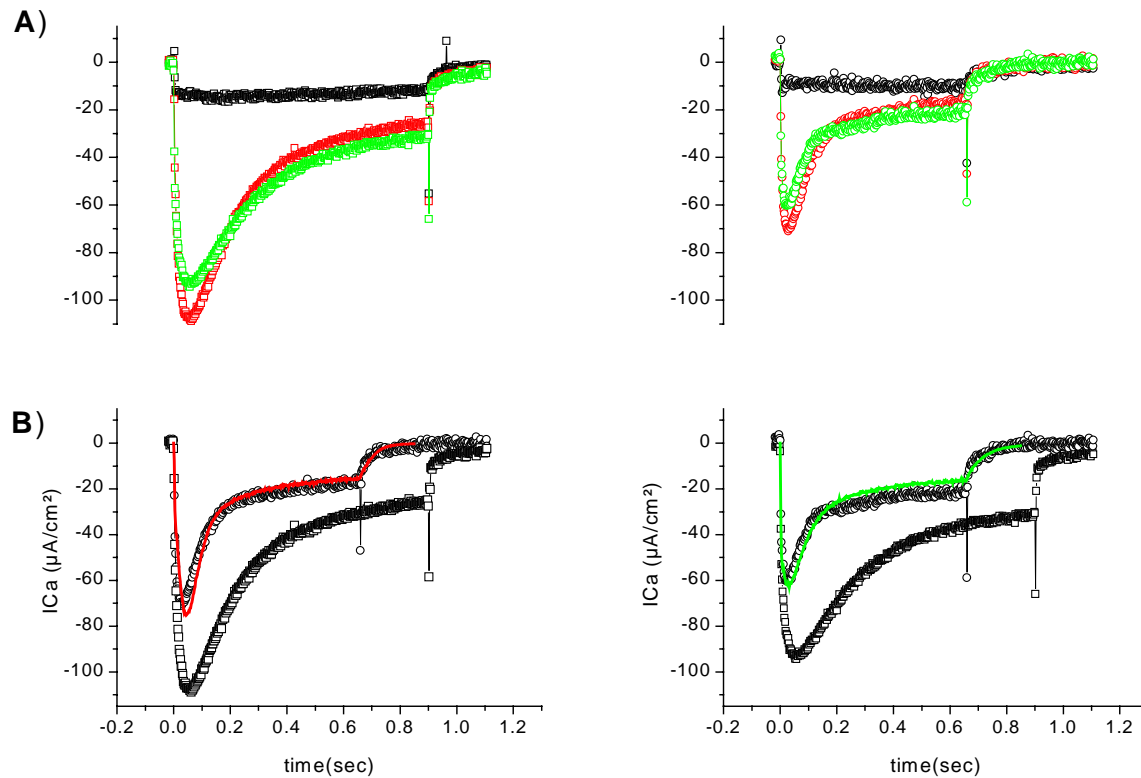
Abbildung 45 zeigt die unterschiedlichen Zeitkonstanten bei den unterschiedlichen Spannungen als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung zusammen mit der Anzahl der Versuche ( $n$ ).





**Abbildung 45** Vergleich der Zeitkonstanten für Kommando-Potentiale von 0 mV (links) und +20 mV (rechts) in ungepuffelter (massiv) und gepuffelter (///) Lösung. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Bei den Kommando-Potentialen von  $-20$  mV war oft nur ein sehr kleiner Einstrom festzustellen, der sich unter den unterschiedlichen Bedingungen (gepuffert bzw. ungepuffert) nicht unterschied. Dies ist in der folgenden Abbildung noch einmal für eine weitere Faser dargestellt. Die Farben und Symbole haben die selbe Bedeutung wie in der vorherigen Abbildung.



**Abbildung 46** Messung und Simulation einer weitem Einzelfaser bei 30°C. Faserparameter: Radius  $a=24\text{ }\mu\text{m}$ , Länge  $l=560\text{ }\mu\text{m}$ . Eingangswiderstand  $r_s=0-50\text{ }\Omega\text{cm}^2$ ,  $\rho=0.006$ . (Faser f21o99) A) Zeitliche Entwicklung der experimentellen Ströme in gepufferter Lösung (Quadrate, links) 0 mV (rot) und +20 mV (grün) und in ungepufferter Lösung (Kreise, rechts). B) Vergleich von Messung und Simulation (Linie) für jedes Kommando-Potential (0 mV links und +20 mV rechts). Hier wurde wiederum der gepufferte Strom als Simulationsinput benutzt.

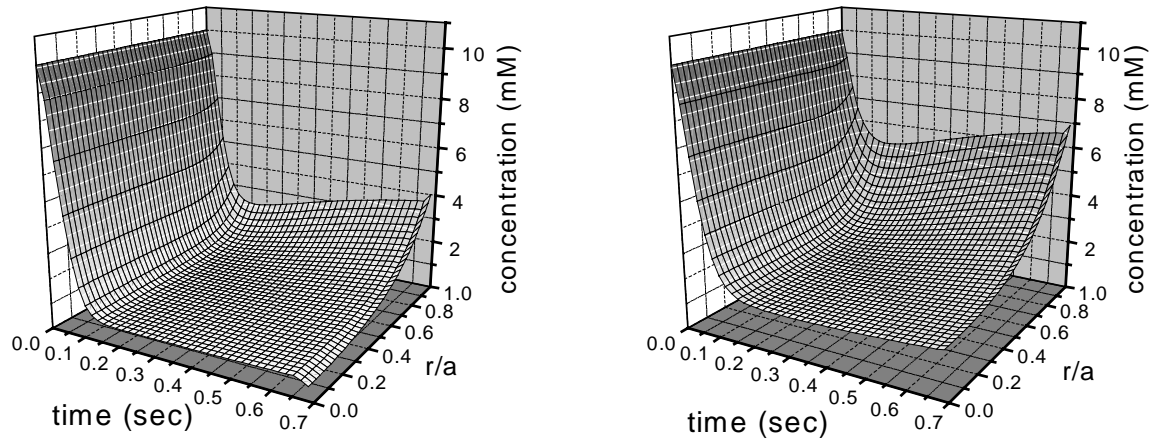
Die Faserparameter der Fasern aus den vorangegangenen Abbildungen sowie deren Zeitkonstanten sind in der folgenden Tabelle 8 zusammengefasst.

Parameter	F12d98	F21o99	F22o99
Faserradius $a$ ( $\mu\text{m}$ )	35 $\mu\text{m}$	24 $\mu\text{m}$	24 $\mu\text{m}$
Faserlänge $l$ ( $\mu\text{m}$ )	650 $\mu\text{m}$	560 $\mu\text{m}$	640 $\mu\text{m}$
Temperatur $T$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	23 $^{\circ}\text{C}$	29.7 $^{\circ}\text{C}$	29.7 $^{\circ}\text{C}$
TTS Eingangswiderstand $r_s$ ( $\Omega\text{cm}^2$ )	200 $\Omega\text{cm}^2$	-20mV: 50 $\Omega\text{cm}^2$ 0mV: 0 $\Omega\text{cm}^2$ +20mV: 0 $\Omega\text{cm}^2$	-20mV: 120 $\Omega\text{cm}^2$ 0mV: 80 $\Omega\text{cm}^2$ +20mV: 30 $\Omega\text{cm}^2$
Bruchteil des TTS Volumens am Gesamtvolumen der Faser $\rho$	0.004	-20mV: 0.006 0mV: 0.006 +20mV: 0.006	-20mV: 0.007 0mV: 0.0055 +20mV: 0.006
Zeitkonstante in ungepufferter Lösung $\tau_{\text{unbuff}}$ (sec)	97 msec	-20mV: --- 0mV: 86 msec +20mV: 109 msec	-20mV: --- 0mV: 50 msec +20mV: 37 msec
Zeitkonstante in gepufferter Lösung $\tau_{\text{buff}}$ (sec)	208 msec	-20mV: --- 0mV: 193 msec +20mV: 253 msec	-20mV: --- 0mV: 228 msec +20mV: 287 msec
Inaktivierungs-Zeitkonstante nach dem Testpuls in gepufferter Lösung $\tau_{\text{tail}}$ (sec)	---	-20mV: $(42 \pm 9)$ msec 0mV: $(48 \pm 8)$ msec +20mV: $(53 \pm 6)$ msec	-20 mV: $(62 \pm 10)$ msec 0 mV: $(62 \pm 7)$ msec +20 mV: $(54 \pm 6)$ msec
Mittlere Konzentration im stationären Zustand ( <i>steady-state</i> ) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{avg}}$ (mM)	0.984 mM	-20mV: 7.8 mM 0mV: 3.28 mM +20mV: 4.29 mM	-20mV: 7.5 mM 0mV: 1.05 mM +20mV: 2.56 mM
<i>Steady-state</i> $[\text{Ca}^{2+}](r=0)$ in der Fasermittelpunkt (mM)	0.28 mM	-20mV: 7.2 mM 0mV: 0.74 mM +20mV: 1.69 mM	-20mV: 6.5 mM 0mV: 0.7 mM +20mV: 1.53 mM

**Tabelle 8:** Faserparameter und Werte für Messungen und Simulationen in isotoner Lösung.

## 2. Berechnete Konzentrationsänderungen

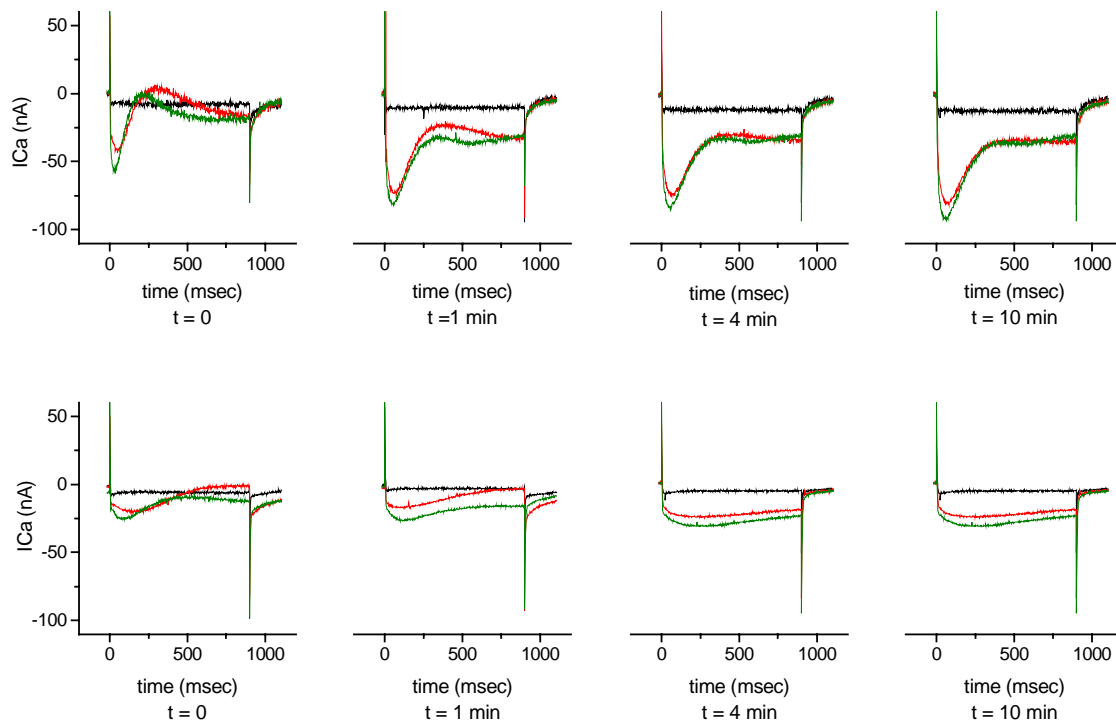
Die resultierende berechnete  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im TTS ist für die Faser f\_99O22 in der folgenden Abbildung 47 gezeigt, links für ein Membranpotential von +0 mV, recht für ein Potential von +20 mV.



**Abbildung 47** Simulierte Konzentrationsverteilung einer repräsentativen Einzelfaser, links 0 mV, rechts: +20 mV. (Faser f\_99O22, siehe weiter oben)

### 3. Zeitliche Entwicklung der Pufferwirkung

Die zeitliche Entwicklung der Wirkung des Puffers auf den Zeitverlauf der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme liefert einen weiteren Hinweis auf die Korrektheit der *Depletion*-Theorie. Die Untersuchungen zeigen deutlich, daß die "Inaktivierung" mit dem Lösungswechsel von ungepuffert auf gepufferte Lösung langsamer einsetzt. In der folgenden Abbildung wurden die Ionenströme für jeweils 3 Kommando-Potentiale (-20 mV: Schwarz; 0 mV: rot; +20 mV: grün) bei einer Temperatur von 23°C (oben) und bei einer Temperatur von 10°C (unten) aufgenommen. Links sind die Daten von Messungen in der ungepufferten Lösung zu sehen. Danach erfolgte der Lösungswechsel. Von links nach rechts sind die Ströme eine Minute nach dem Lösungswechsel auf die gepufferte Lösung, nach 4 Minuten und nach 10 Minuten gezeigt.



**Abbildung 48:** Zeitliche Entwicklung der Pufferwirkung bei einer Temperatur von  $T=23^{\circ}\text{C}$  (oben) und bei  $T=10^{\circ}\text{C}$  (unten).

Ganz links: Messung in ungepufferter Lösung mit anschließendem Lösungswechsel auf gepufferte Lösung. Von links nach rechts: nach 1 Minute, nach 4 Minuten, nach 10 Minuten. Man beachte die langsamere Kinetik und die erhöhte Amplitude mit zunehmender Zeit.

Noch deutlicher wird der Effekt bei tieferen Temperaturen sichtbar, denn die intrinsische Inaktivierungskinetik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ist hier extrem verlangsamt. Weiterhin wird eine Abnahme der maximalen Amplitude um einen Faktor von 3.6 bei tieferen Temperaturen beobachtet. Aufgrund der insgesamt erniedrigten Membranleitfähigkeit ist die Güte der Spannungskontrolle an den Faserenden (d. h. bei  $x = \pm l/2$ ) nochmals erhöht (siehe auch GRUNDLAGEN). Somit ist die Hypothese einer gleichmäßig depolarisierten Faser über die gesamte Faserlänge noch besser erfüllt.

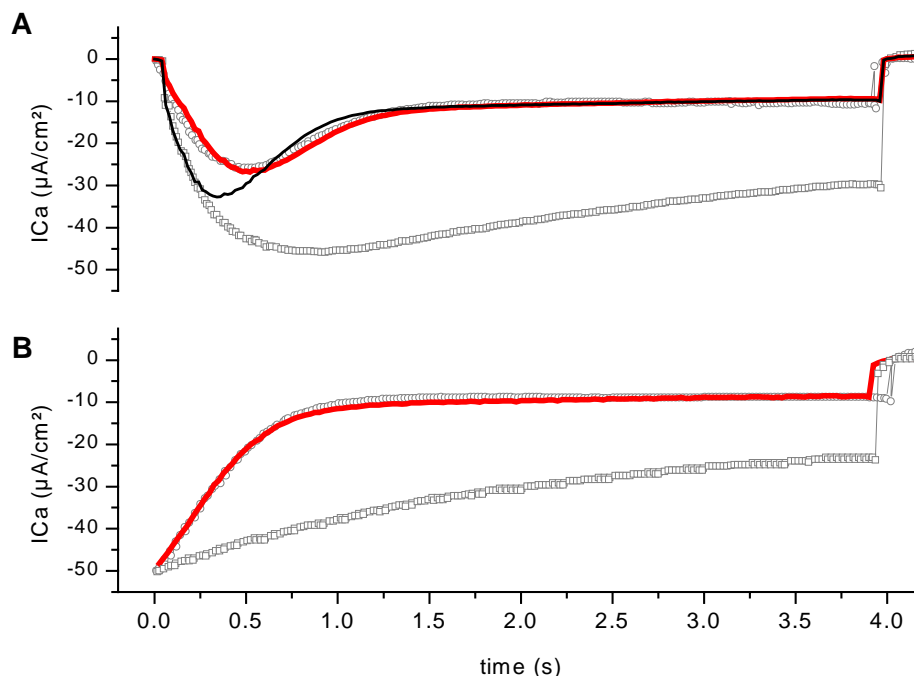
#### 4. Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung

Zur Untersuchung des Einflusses der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung wurden vergleichende Messungen von Almers et al. (1981) herangezogen. In diesen Messungen wurde eine Änderung der intrazellulären Konzentration mit einer 80 mM EGTA Lösung verhindert. Die nächste Abbildung zeigt wiederum den Stromverlauf in extrazellulär gepufferter (Quadrate) und ungepufferter (Kreise) Lösung zusammen mit den theoretischen Vorhersagen

(Linien). In A) wird das Standard-Pulsprotokoll benutzt, hierbei wurde eine Reduktion der Eingangsamplitude um den Faktor 1.4 eingeführt (rote Linie), um die Simulationsergebnisse dem experimentellen Zeitverlauf in ungepufferter Lösung anzupassen (ohne Anpassung: schwarze Linie).

In B) werden durch einen Vorpuls von +70 mV sämtliche DHP-Kanäle geöffnet, somit entfällt der Einfluß der spannungsabhängigen Aktivierung. Der gemessene Strom in gepufferter Lösung beinhaltet dann nur die spannungsabhängige Inaktivierung (siehe DISKUSSION und Almers et al., 1981).

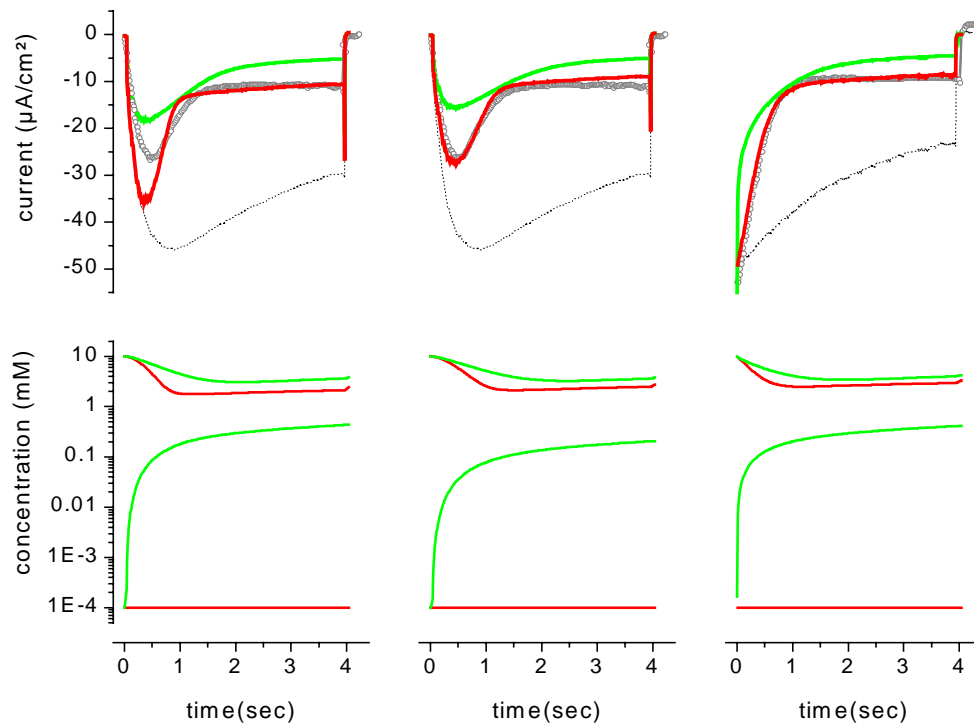
Man beachte die unterschiedliche Zeitskala von 4 Sekunden im Vergleich zur Zeitskala an intakten Fasern von 1 Sekunde.



**Abbildung 49:** Experiment (Symbole) und Simulation (Linien) von Froschfasern mit der *Vaseline-Gap* Methode in intrazellulär gepufferter Lösung (Experimentelle Daten aus Almers et al., 1981).

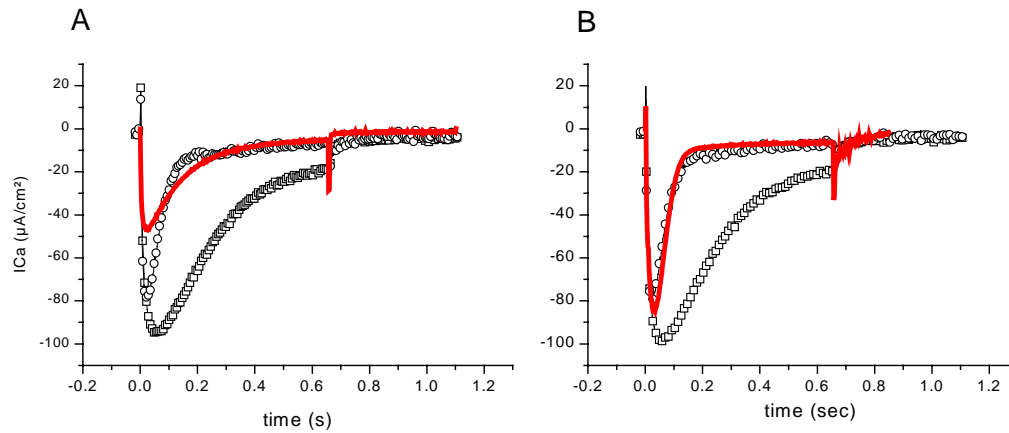
A) Standard Pulsprotokoll. Messung in gepufferter (Quadrate) und ungepufferter (Kreise) Lösung im Vergleich zu den Simulationen (schwarz: ohne zusätzliche Normierung, rot: mit Reduktion der Eingabedaten um das 1.4 fache, siehe Text). B) Tail-currents. Symbole und Linien haben die gleiche Bedeutung wie in A. Faserparameter:  $a=70 \mu m$ ,  $r_s=20 \Omega cm^2$ .

In der folgenden Abbildung wird der Einfluß untersucht, den eine zusätzliche intrazelluläre Konzentrationsänderung hervorrufen würde.



**Abbildung 50:** Experiment (schwarz) und Simulation (rot) von Froschfasern mit der *Vaseline-Gap* Methode in intrazellulär gepufferter Lösung (Experimentelle Daten aus Almers et al., 1981). Weiterhin wurde der Einfluß einer zusätzlichen intrazellulären Konzentrationsänderung simuliert (grün). Oben: Stromverlauf, unten: Konzentrationsänderung intrazellulär (untere Kurven) und extrazellulär (obere Kurven). Links und Mitte: Standard Pulsprotokoll. Rechts: Tail-currents. Faserparameter:  $a=70 \mu\text{m}$ ,  $r_s=20 \Omega\text{cm}^2$ .

Wird auch bei den Simulationen der 2-MVC Experimente an kontrahierenden Fasern eine zusätzliche Änderung der intrazellulären Konzentration eingeführt, weichen die Simulationen von den experimentellen Daten in ungepufferter Lösung ab.



**Abbildung 51** Abweichender Verlauf von Messung und Simulation bei einer simulierten Konzentrationsverteilung mit zusätzlicher intrazellulärer Konzentrationsänderung (A, links) bei Experimenten an intakten kontrahierenden Fasern (Faser f\_99O22, Depolarisation auf 0 mV, siehe weiter oben). Im Vergleich ist in B, rechts) die Simulation ohne zusätzliche intrazelluläre Konzentrationsänderung dargestellt.

Die starken Abweichungen vom berechneten Verlauf ohne zusätzliche intrazelluläre Konzentrationsänderungen  $I_{sim}^{unbuff}(t)$  und somit auch vom experimentell aufgenommenen Strom  $I_{exp}^{unbuff}(t)$  in ungepufferter Lösung werden ausführlich im Kapitel DISKUSSION erörtert. Es sei an dieser Stelle bemerkt, daß bei den Messungen in gepufferter Lösung ebenfalls eine intrazelluläre Konzentrationsänderung stattfindet, die bereits in den Messungen berücksichtigt ist. Somit sollte die intrazelluläre Konzentrationsänderung bei den ungepufferten Messungen sogar weniger stark ausfallen, als es bei den Messungen in der gepufferten Lösung der Fall ist.

Bei den Experimenten mit der *Vaseline-Gap* Methode wurden die Messungen mit extrazellulär gepufferter bzw. ungepufferter Lösung bei jeweils intrazellulärgepufferter Konzentration durchgeführt, somit wird auch hier eine zusätzliche Änderung der intrazellulären Konzentration abweichende Ergebnisse liefern. Ein Vergleich der beiden Experimente ist aufgrund von Faserunterschieden nicht möglich (siehe DISKUSSION)

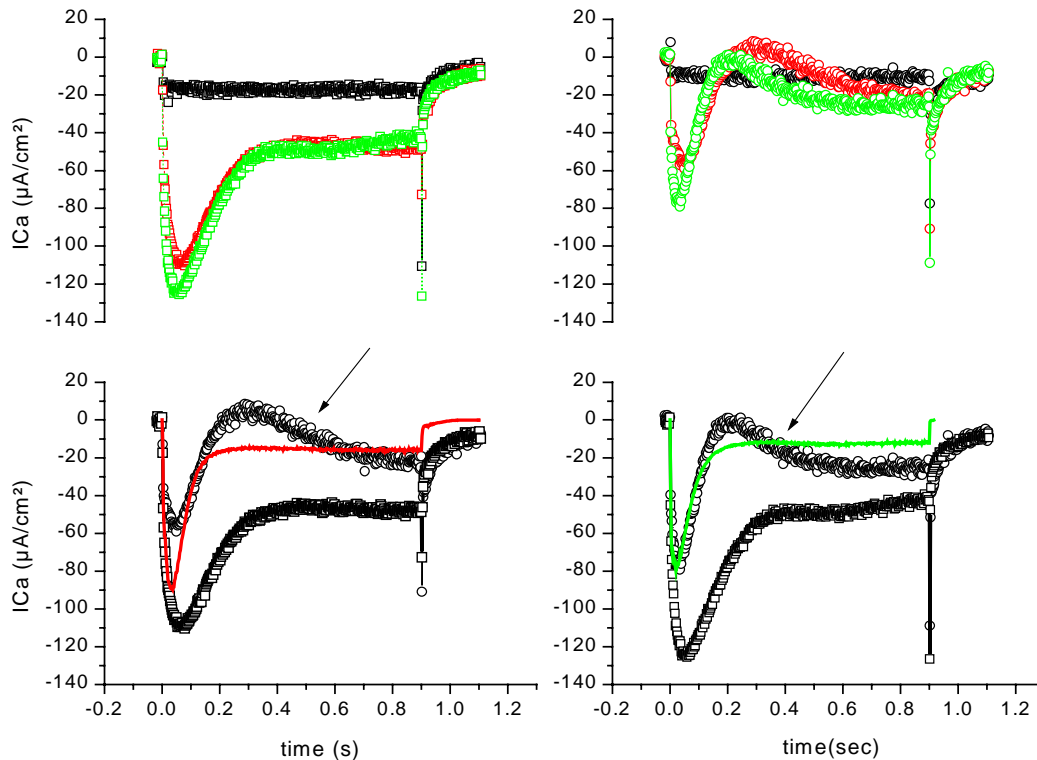
## 5. Zweiter "Anstieg" der Strom-Amplitude in einigen Fasern

Bei einigen Fasern wurde ein zweiter Anstieg des Stroms nach ca. 400 msec beobachtet.

Hier wurden wiederum die Messungen in gepufferter Lösung als Input für die Simulation benutzt, und die Simulationsergebnisse mit den Messungen in ungepufferter Lösung verglichen. Der grobe Verlauf der schnelleren Inaktivierung wird wiederum korrekt vorhergesagt. Der



Bereich zwischen 200 msec und 500 msec bei Temperaturen von 23°C kann durch die Konzentrationsänderungen alleine nicht erklärt werden, da teilweise Auswärtsströme gemessen wurden. Bei einer durch den *Depletion*-Effekt bedingten Abnahme der Ströme kann es allerdings nicht zu diesem Verhalten kommen.



**Abbildung 52** Abweichende Ergebnisse von Messung und Simulation einer Einzelfaser bei 23°C. Bei einigen Fasern wurde ein "Wiederanstieg" der Stromamplitude nach etwa 400-500 msec beobachtet (Pfeile). Möglicherweise handelt es sich allerdings um ein Überschießen der Inaktivierung, die durch einen unspezifischen Ausstrom vorgetäuscht werden könnte, weiters siehe Text. Faserparameter: Radius  $a=21\text{ }\mu\text{m}$ , Länge  $l=560\text{ }\mu\text{m}$ . Eingangswiderstand  $r_s=200\text{ }\Omega\text{cm}^2$ ,  $\rho=0.014$ . (Faser f\_9o99)

## 6. Eine mögliche Erklärung des "vermeintlichen" Wiederanstiges

Bei einer Überlagerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms mit einem unspezifischen (Kalium-) Ausstrom wäre der zweite Wiederanstieg der Einwärtskomponente nur ein vermeintlicher Wiederanstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms.

Dies wird in der folgenden Abbildung dargestellt. Hier ist gezeigt, wie sich der gemessene Strom (grün, Kreise) durch die Summe (grüne Linie) aus einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom (schwarze Linie) und einen unspezifischen Ausstrom (rote Linie) zusammen setzen könnte.

Für die Abbildung wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom vereinfacht durch eine zweifache Exponentialfunktion dargestellt (siehe z.B. Makabe et al., 1996):

$$\tilde{I}_{Ca}(t) = -100 \cdot (1 - \exp\{-t/\tau_{act}\}) \cdot \exp\{-t/\tau_{inact}\} - y_0 \quad (138)$$

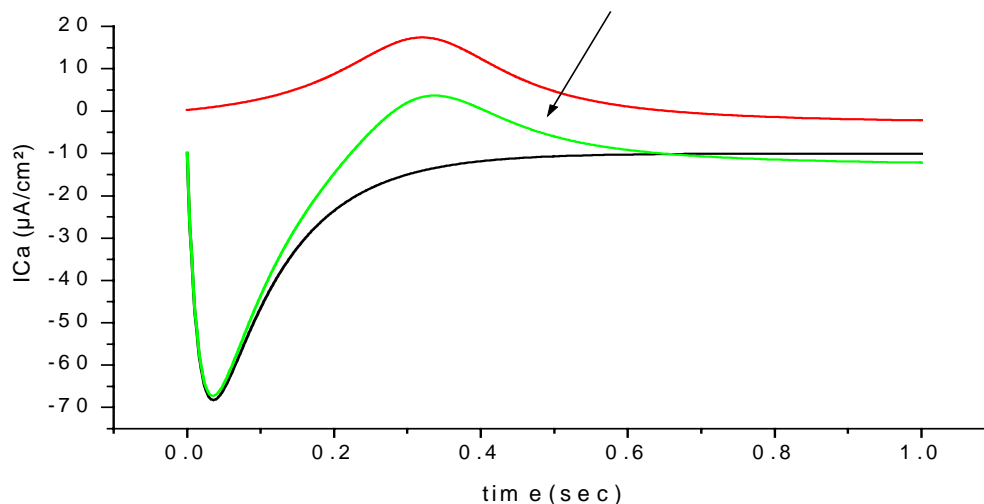
wobei die Zeitkonstanten  $\tau_{act} = 40$  msec und  $\tau_{inact} = 100$  msec und die Restaktivität  $y_0 = 20 \mu A/cm^2$  gesetzt wurden.

Die unspezifischen  $K^+$ -Ströme  $\tilde{I}_{aus}(t)$  wurden mit einer modifizierten Lorentz-Peak Funktion dargestellt:

$$\tilde{I}_{aus}(t) = \frac{2A}{\pi} \left( \frac{w}{4(t - \tau_{delay})^2 + w^2} \right) \quad (139)$$

wobei  $\tau_{delay} = 200$  msec,  $w = 0.247$  msec und  $A = 12.8 (\mu A/cm^2)msec$ .

Man beachte, daß diese Darstellung für den unspezifischen Ausstrom nur zur Verdeutlichung benutzt wird, die Lorentz-Peak Funktion hat sicherlich weder eine physiologische Bedeutung noch eine physiologische Erklärung, sondern wird nur zu Anschauungszwecken benutzt.



**Abbildung 53:** Mögliche Erklärung für den „Wiederanstieg“ des Calciumstroms nach ca. 400-500 msec (Pfeil). Gezeigt ist ein vereinfachter  $Ca^{2+}$ -Strom (schwarze Linie), ein unspezifischer Ausstrom (rote Linie) und die Summe der beiden links gezeigten Ströme (grüne Linie).

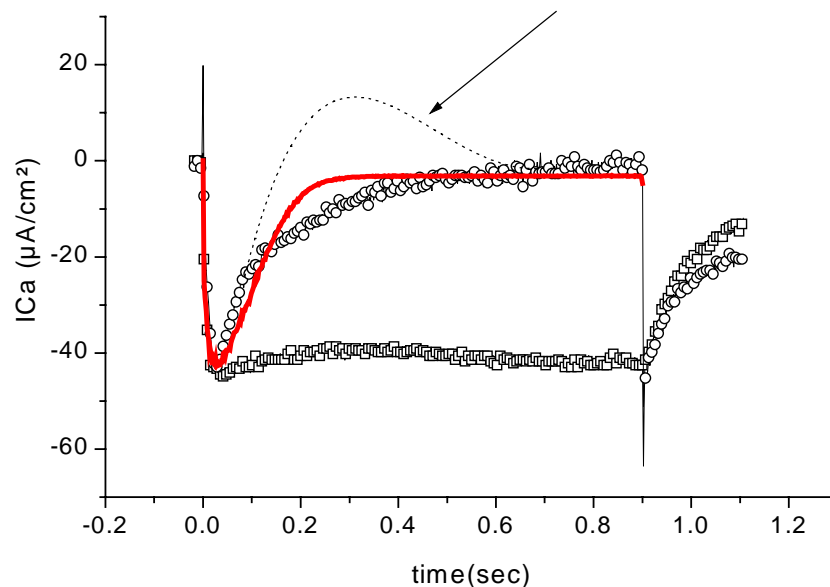
## 7. Messungen in einer "High-Kalium" Lösung

Zur Erklärung des zweiten Anstiegs im angesprochenen Zeitraum von 200 msec bis 500 msec wurde die Hypothese einer möglichen Überlagerung durch einen Kaliumausstrom durch den

$\text{Ca}^{2+}$ -Kanal untersucht. Es gelang sogar an einer Faser, den mehrfachen Lösungswechsel auf eine "High-Kalium Lösung" durchzuführen.

Hierbei wurde das extrazelluläre Kalium auf eine Konzentration von 140 mM KBr in ungepufferter Lösung und 154 mM KBr in gepufferter Lösung erhöht um das Nernstpotential für Kalium auf einen Wert von  $E_K=0$  mV zu erhöhen. Bei einer Faser mit dem zweiten Anstieg der Amplitude in ungepufferter Lösung gelang der Lösungswechsel auf die High-Kalium Lösung. Interessanterweise fehlt hier der zweite Anstieg bei einem Kommando-Potential von  $V_{\text{clamp}}=0$  mV.

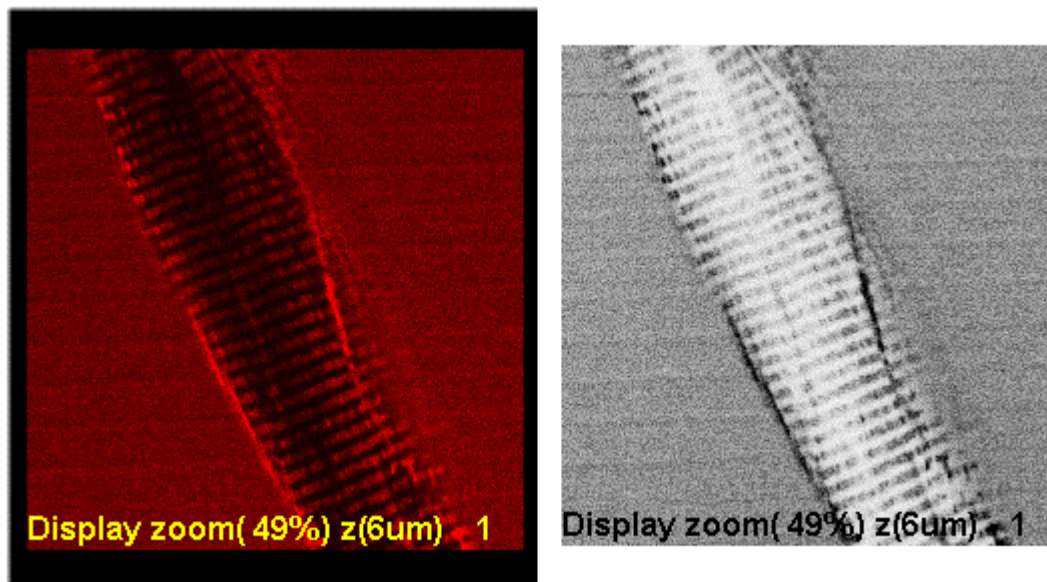
In der folgenden Abbildung 54 sind die Daten für eine Messung von  $I_{\text{exp,high}_K}^{\text{unbuff}}(t)$  in ungepufferter (Kreise) und von  $I_{\text{exp,high}_K}^{\text{buff}}(t)$  gepufferter (Quadrate) High-Kalium Lösung zusammen mit der Simulation  $I_{\text{sim,high}_K}^{\text{unbuff}}(t)$  (rot) gezeigt. Die Faserparameter sind in der Legende zur Abbildung beschrieben.



**Abbildung 54** Messung einer Faser mit zweiter Stromkomponente in einer High-Kaliumlösung. Der zweite "vermeintliche Anstieg" (gestrichelt) ist nicht mehr vorhanden. Faserdurchmesser: 48  $\mu\text{m}$ , Länge 560  $\mu\text{m}$ . Aufgrund der mehrfachen Lösungswechsel und der massiv erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration war bislang nur eine einzige Messung möglich. Eine begründete Aussage für oder gegen die Annahme kann daher nicht getroffen werden.

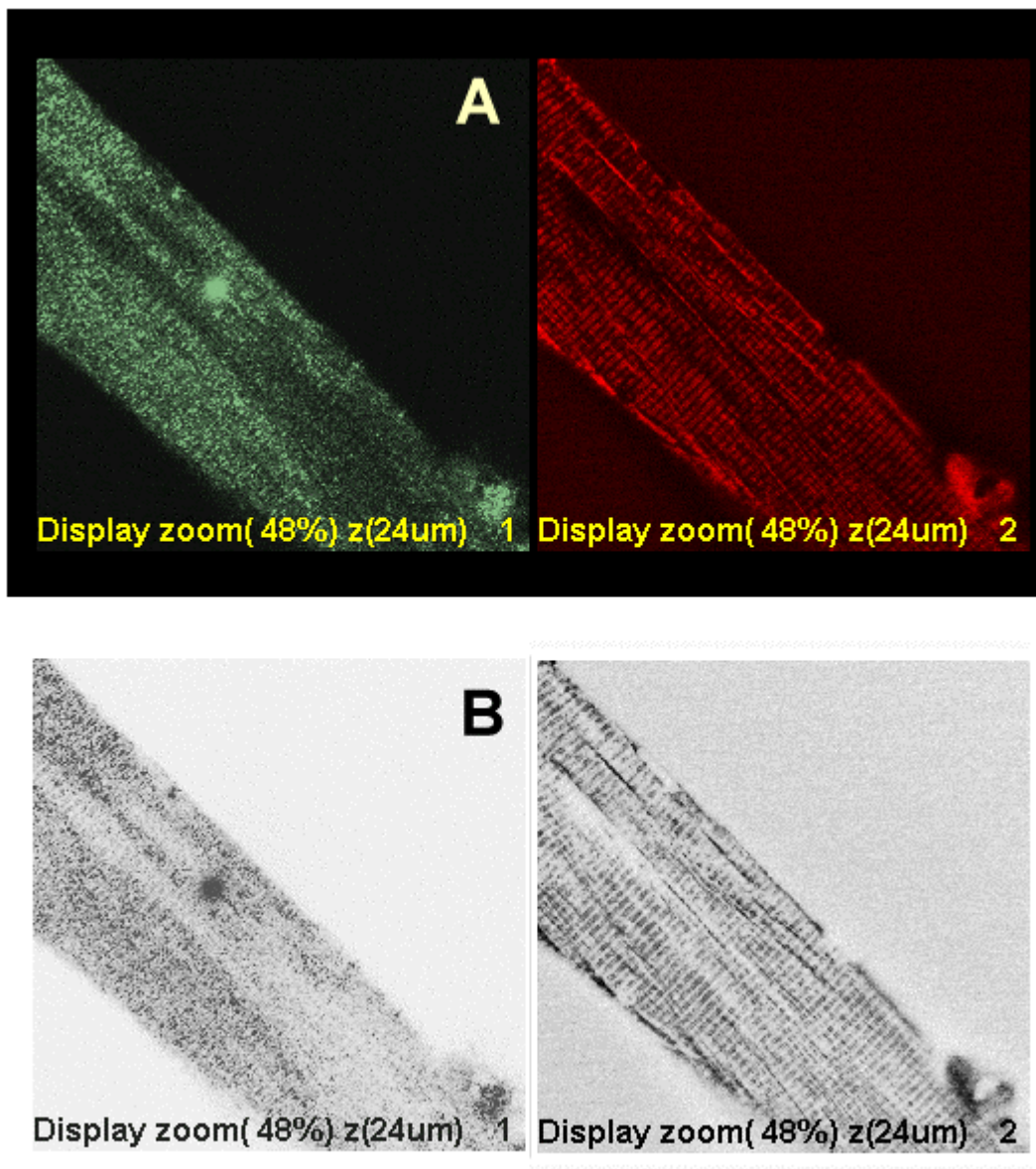
#### D. Messung der extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die räumlich und zeitlich aufgelösten Messungen der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden an Einzelfasern des *M. interosseus* durchgeführt. Dabei waren jeweils mehrere Fasern in der mit etwa 500  $\mu\text{l}$  normaler isotoner 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Testlösung gefüllten Meßkammer. Das Originalbild ist in A) gezeigt, in B) wurde das Negativbild dargestellt, wobei „weiß“ der Information „kein Signal“ entspricht. Bei der Aufnahme handelt es sich um einen transversalen Schnitt im oberen Drittel der Faser.



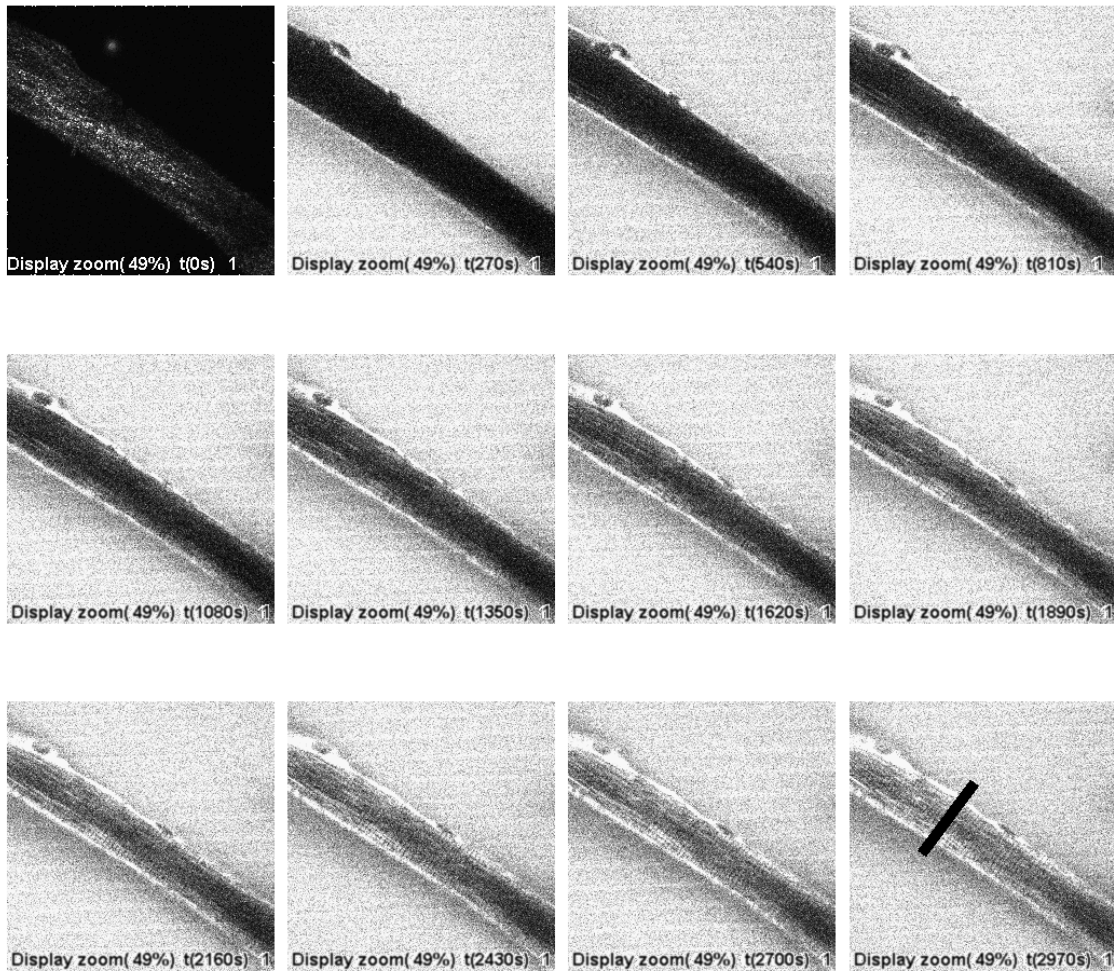
**Abbildung 55:** Fluoreszenzsignal eines transversaler Schnitts durch eine Skelett-Muskelfaser (*M. interosseus*) in isotoner  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluoreszenzlösung. A) Originalbild, B) Negativbild. Bildausschnitt: 150  $\mu\text{m}$  x 150  $\mu\text{m}$

Die folgende Abbildung zeigt ein Zweikanalbild, dabei wurde der Farbstoff mit der roten Wellenlinie (568 nm) des Lasers angeregt, während gleichzeitig mit der grünen Wellenlinie (488 nm) ein Reflektionsbild der Faser aufgenommen wurde.



**Abbildung 56:** Zweikanalaufnahme des Reflektionsbildes (links) und des Fluoreszenzsignals (rechts) einer Muskelfaser (*M. interosseus*) in isotoner  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluoreszenzlösung. A) Originalbild, B) Negativbild.

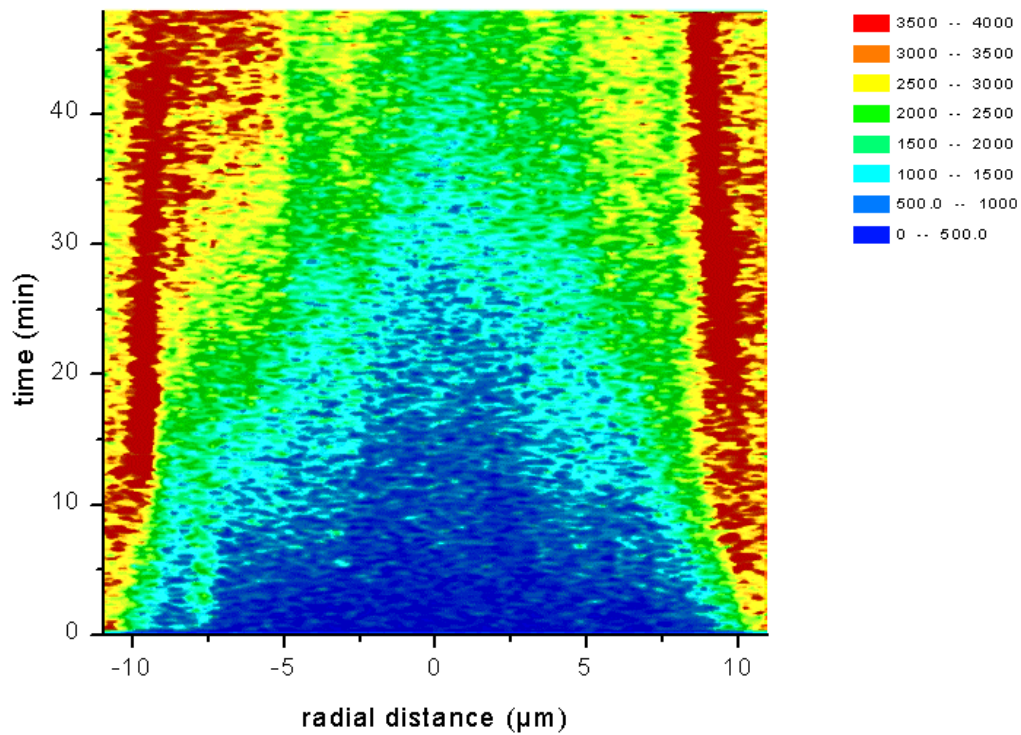
Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurde ein manueller Lösungswechsel auf die Farbstoff-Lösung vollzogen (siehe MATERIAL & METHODEN, Abschnitt F). In der folgenden Abbildung wird die zeitliche Entwicklung der Farbstoffeindiffusion in das TTS dargestellt. Die Aufnahmedauer für ein Bild betrug  $t_b = 21.6$  s, die Bilder sind im Abstand von  $t_s = 54$  s aufgenommen, dargestellt ist jedes 50ste Bild.



**Abbildung 57:** Zeitliche Entwicklung der Farbstoffeindiffusion in das TTS. Der Lösungswechsel findet zum Zeitpunkt  $t=0$  statt und ist im Bild links oben gezeigt. Die Linie im Bild rechts unten bezeichnet die ROI für die folgende Auswertung.

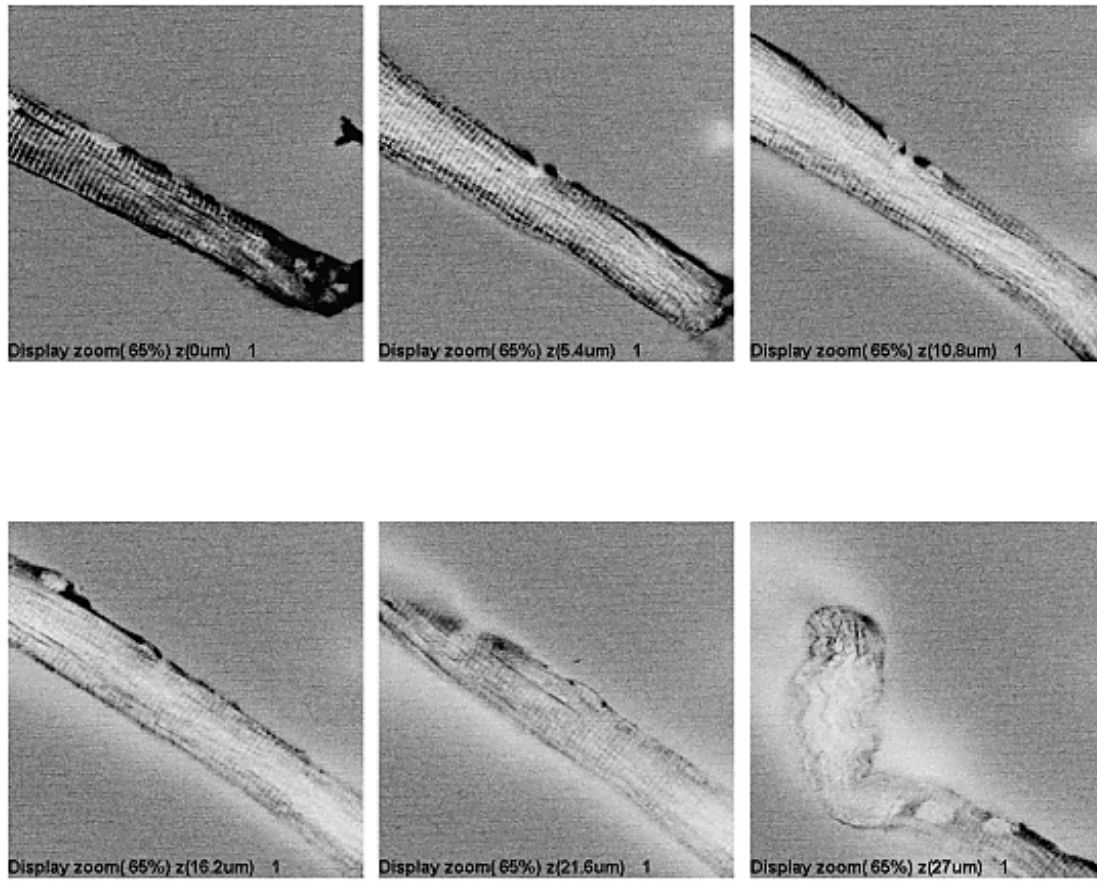
Die Linie zeigt den Ausschnitt ("*Region of Interest*", ROI), der für die Auswertung radialen Fluoreszenzprofils ausgewählt wurde.





**Abbildung 58:** Radiales Fluoreszenzprofil für die oben ausgewählte ROI im Falschfarbenkonturplot (rot=100%, blau=0%).

Nach etwa 20 bis 1000 Bildaufnahmen wurde die Membran der Faser durch die hohe eingestrahlte Laserintensität zerstört (siehe auch DISKUSSION). Ein Beispiel ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Es handelt sich um einen x-y-z Scan bei einer Laserintensität von 6% der Maximalleistung.



**Abbildung 59** Beispiel einer während der Messung zerstörten Faser (xy-z Scan)



## **E. $K^+$ -Ströme**

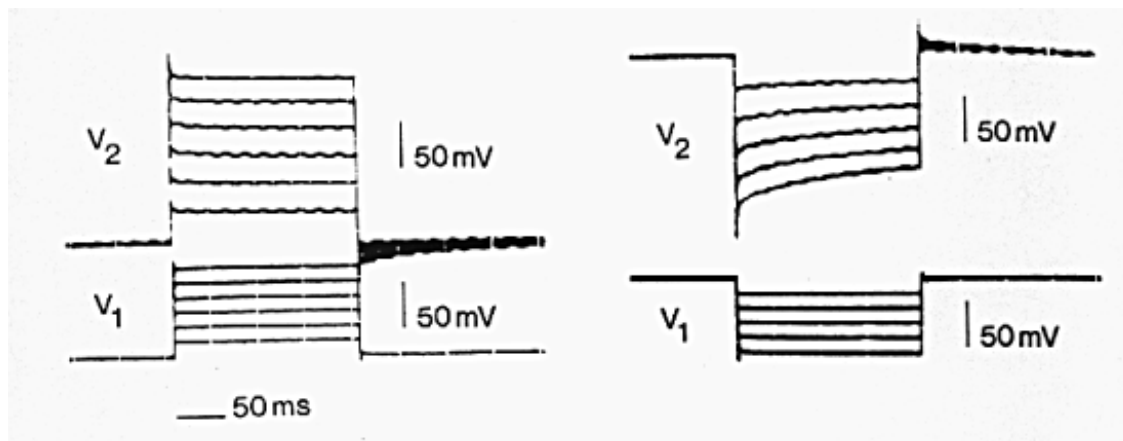
Die bisherigen Simulationen in Abschnitt C wurden für den Fall einer Abnahme der Ionenkonzentration im TTS durchgeführt. Die Abnahme der Konzentration wird durch einen Einstrom von Ionen aus dem Extrazellulärmedium ins Faserinnere hervorgerufen. Beispiele hierfür sind die  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$ -Ströme bei Depolarisation der Faser und  $K^+$ -Ströme bei Hyperpolarisation der Faser. Die Leitfähigkeit für  $Na^+$ -Ionen inaktiviert durch die Kanaleigenschaften der  $Na^+$ -Kanäle sehr rasch (d.h. im Zeitraum von etwa 3 ms), und eine Änderung der Konzentration macht sich kaum bemerkbar.

Bei einem Ausstrom von Ionen aus dem Zellinneren in das Extrazellulärmedium kommt es zu einem Anstieg der Ionenkonzentration im TTS. Die Untersuchung von Kalium-Auswärtsströmen, die zu einer Anreicherung von Kalium Ionen im TTS führen, ist ebenfalls physiologisch interessant. Es wird diskutiert, ob bei der Muskelererschöpfung (*fatigue*) neben der ATP-Verarmung im Faserinneren auch die extrazelluläre Anreicherung von Kaliumionen im TTS eine Rolle spielt (siehe z.B. Fink et al., 1973; Fink und Lüttgau, 1976; Davies et al., 1991; McKenna, 1992; Allen et al., 1992, Kössler et al., 1990).

Die hier untersuchten  $K^+$ -Ströme wurden von erschöpften Fasern des *M. Sartorius* des Frosches *Rana temporaria* mit der 3-MVC bei einer Temperatur von  $T = 4^\circ C$  aufgenommen. Es handelt sich hierbei um einen Strom durch den ATP-abhängigen Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ ) (siehe auch DISKUSSION), dessen allgemeine Eigenschaften in einem Review-Artikel von Stephen J. H. Ashcroft und Frances M. Ashcroft (1990) zusammengefasst wurden. Die Eigenschaften, die Regulation und die mögliche Funktion der ATP-abhängigen Kaliumkanäle von Muskelzellen werden in einem Review von Davies et al. (1991) vorgestellt.

### **1. Messungen mit der 3-MVC**

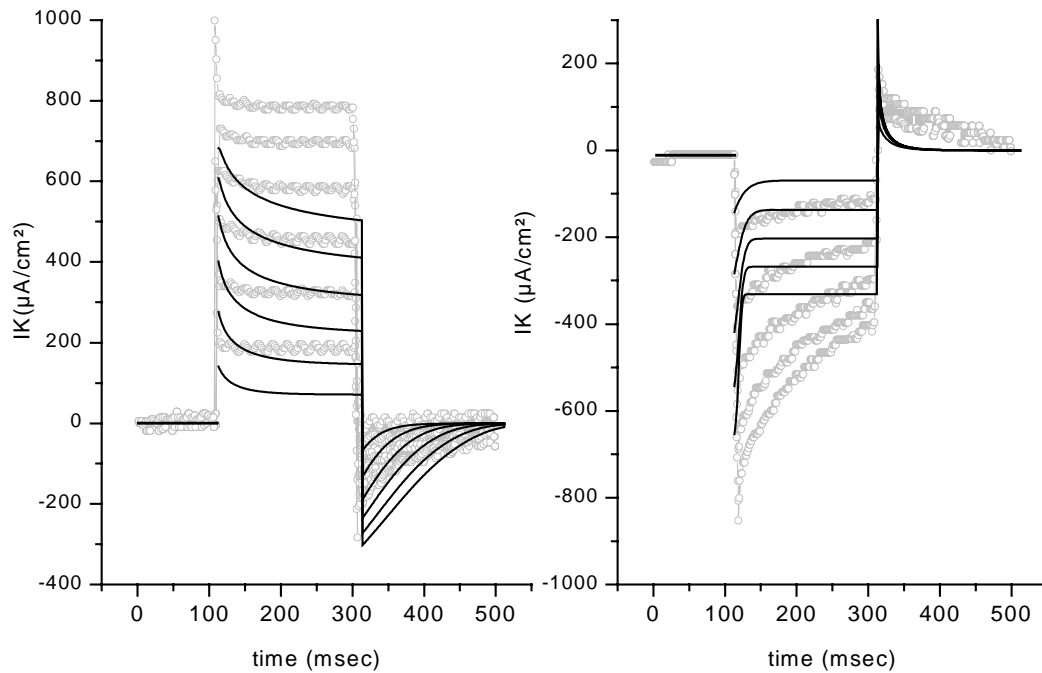
Die Ergebnisse der 3-MVC Messungen in 2.5 mM  $K^+$ -Lösung sind in der folgenden Abbildung für eine repräsentative Faser gezeigt. In den Abbildungen sind jeweils die Spannungen  $V_1$  und  $V_2$  der Elektroden (1) bzw. (2) dargestellt. Links ist der Verlauf für depolarisierende Spannungen ( $K^+$ -Ausstrom, Anreicherung im TTS) gezeigt, rechts der Verlauf für hyperpolarisierende Spannungen ( $K^+$ -Einstrom, Verarmung im TTS).



**Abbildung 60** Messung von  $K^+$ -Strömen einer Froschfaser mit der 3-MVC Methode. Gezeigt sind die Spannungen  $V_1$  und  $V_2$  und den Elektroden (1) und (2) (siehe Methoden). Radius  $a=50\text{ }\mu\text{m}$ , der Abstand der Elektroden beträgt  $250\text{ }\mu\text{m}$ . Innenwiderstand der Faser  $R_i=310\text{ }\Omega\text{cm}$ . Temperatur  $T=4^\circ\text{C}$ .

## 2. Membranstromdichte und Simulation: erste Näherung

Die resultierende Membranstromdichte  $I_m$  kann mit Hilfe des Cole-Theorems (siehe Glg. 58) berechnet werden. In einer ersten Simulation („erste Näherung“) wurde noch keine unterschiedliche Kanaldichte in der TTS-Membran im Vergleich zur Oberflächenmembran (ASM) angenommen ( $\vartheta = 1$ ). Die morphologischen Parameter des Flächenverhältnisses von TTS zu ASM wurde mit dem von Gage (1965) ermittelten Wert von 2:1 festgelegt ( $f_T = 0.66$ ), der Volumenanteil  $\rho$  des TTS am Gesamtvolumen der Faser wurde mit  $\rho=0.4\%$  festgelegt. In der folgenden Abbildung 61 sind die Ergebnisse der Simulation (Linien) zusammen mit den aus den Messungen ermittelten experimentellen Membranstömen (Symbole) gezeigt.



**Abbildung 61** Abweichungen zwischen experimentellen Daten (offene Kreise) und der Simulation (Linien), die aus einer zu stark vereinfachten Betrachtungsweise (sog. "erste Näherung") resultieren. Die Ergebnisse der "kompletten, korrekten Beschreibung" sind in Abbildung 67 dargestellt. Bei Hyperpolarisation ist die Abnahme viel zu stark. Daher muss in weiteren Simulationen eine Modifikation durchgeführt werden (siehe Text). Gezeigt sind die Simulation in erster Näherung im Vergleich zur Messung der  $K^+$ -Ströme. Die Abweichungen werden in der DISKUSSION behandelt. Links: Depolarisation, rechts: Hyperpolarisation.

Die insgesamt zu niedrigen Amplituden sowie der zu schnelle Verlauf der Inaktivierung werden ausführlich im Kapitel DISKUSSION erläutert.

Da für die untersuchten Kaliumströme auch ein Stromfluß durch die Oberflächenmembran stattfinden kann, ist es möglich, daß die Konzentrationsänderungen nicht nur im TTS stattfinden, sondern auch direkt in der Nähe der Faseroberflächenmembran.

### 3. Veränderung von $\rho$ bei großen Stromdichten

Um diese Konzentrationsänderungen mit in die Simulation einzubeziehen, wurde in einem ersten Schritt ein variables  $\rho$  zugelassen. Die Änderung der Konzentration führt zu einer effektiven Ladungsverschiebung. Geht man von einer vollständigen Verarmung der Ionenkonzentration aus, kann der Bruchteil  $\rho$  der verarmten Region im Vergleich zum Gesamtvolumen der Faser berechnet werden (Adrian et al. 1970). In den experimentellen Messungen wurde die Kalium-Volumenstromdichte (d.h. der Kaliumstrom pro Einheitsvolumen)  $j_m^K(\infty)$  im stationären Zustand durch graphische Extrapolation bestimmt.

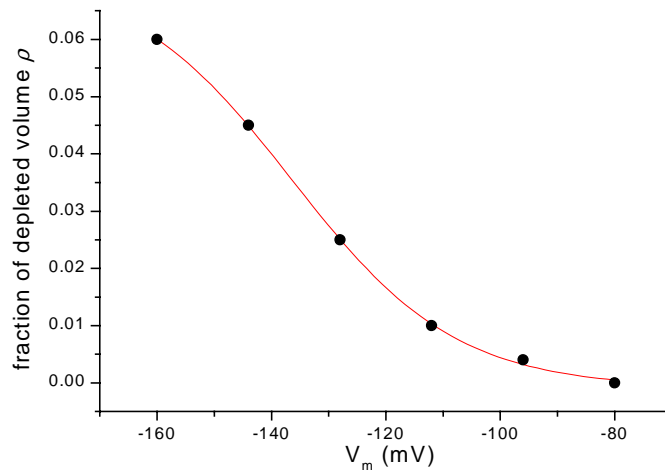
Die Ladung  $Q$  ist gegeben mit:

$$Q = \int_{t=0}^{t=\infty} [j_m(t) - j_m(\infty)] dt \quad (140)$$

bzw.

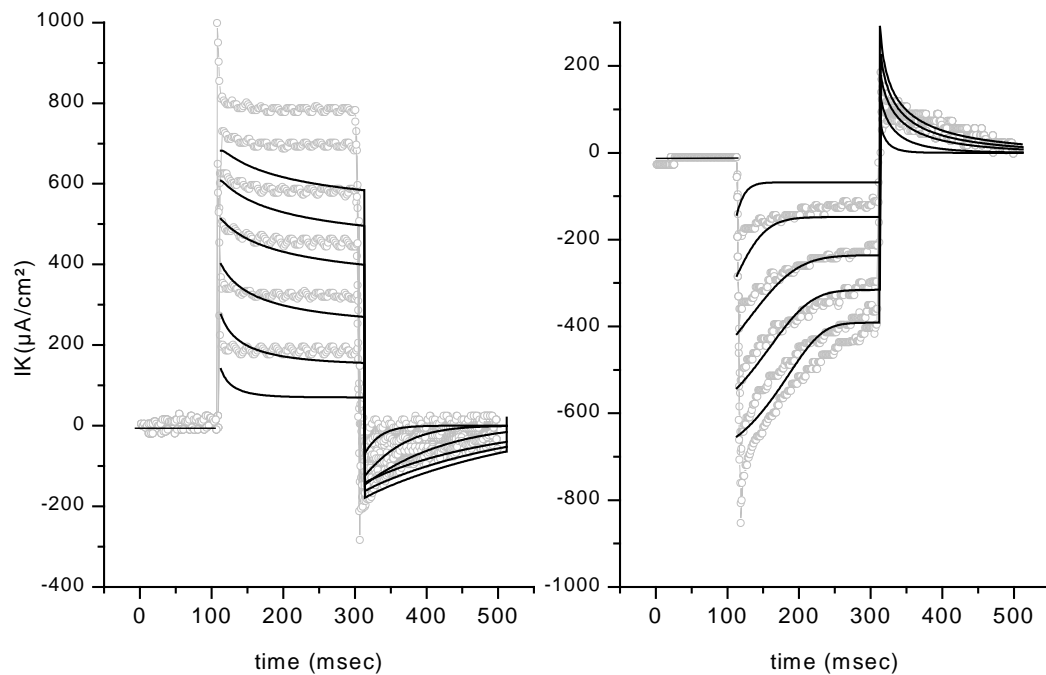
$$Q = \rho [K]_o F \quad (141)$$

Der so ermittelte Bruchteil  $\rho$  des verarmten Volumens ist in der folgenden Abbildung 62 dargestellt.



**Abbildung 62** Werte des Bruchteils  $\rho$  am Gesamtvolumen der Faser in dem es zu Konzentrationsänderungen kommt, für große Stromdichten wird zusätzlich zum TTS-Volumen auch ein kleiner Bereich an der Faseroberfläche beeinflusst.

Dabei stiegen die Werte für  $\rho$  von 0.0026 bis auf über 0.06 für größere Einströme und Hyperpolarisationen von ca. -160 mV an. Ein ähnlicher Anstieg wurde auch von Standen *et al.* (1979) in nicht erschöpften Fasern beobachtet, dort war die Änderung aber aufgrund der etwa zehnfach kleineren Stromdichte nicht so stark ausgeprägt. Die folgende Abbildung zeigt die Simulationsergebnisse (Linien) bei Verwendung des variablen  $\rho$  im Vergleich zu den Messungen (Symbole).



**Abbildung 63** Interessanterweise tritt eine Verbesserung der Übereinstimmung der Simulationsergebnisse (Linien) mit den experimentellen Ergebnissen (offenen Kreise) bei der Simulation der  $K^+$ -Ströme mit einem variablen  $p$  auf, deutlicher im Bereich der Hyperpolarisation (siehe Text). Auf die Amplitude der Depolarisation und den schnellen Verlauf bei kleinen Hyperpolarisationen hat diese Änderung nur einen geringen Einfluß und führt nur zu geringen Verbesserungen. Bemerkenswert ist die annähernd korrekte Wiedergabe der *Tail-currents*.

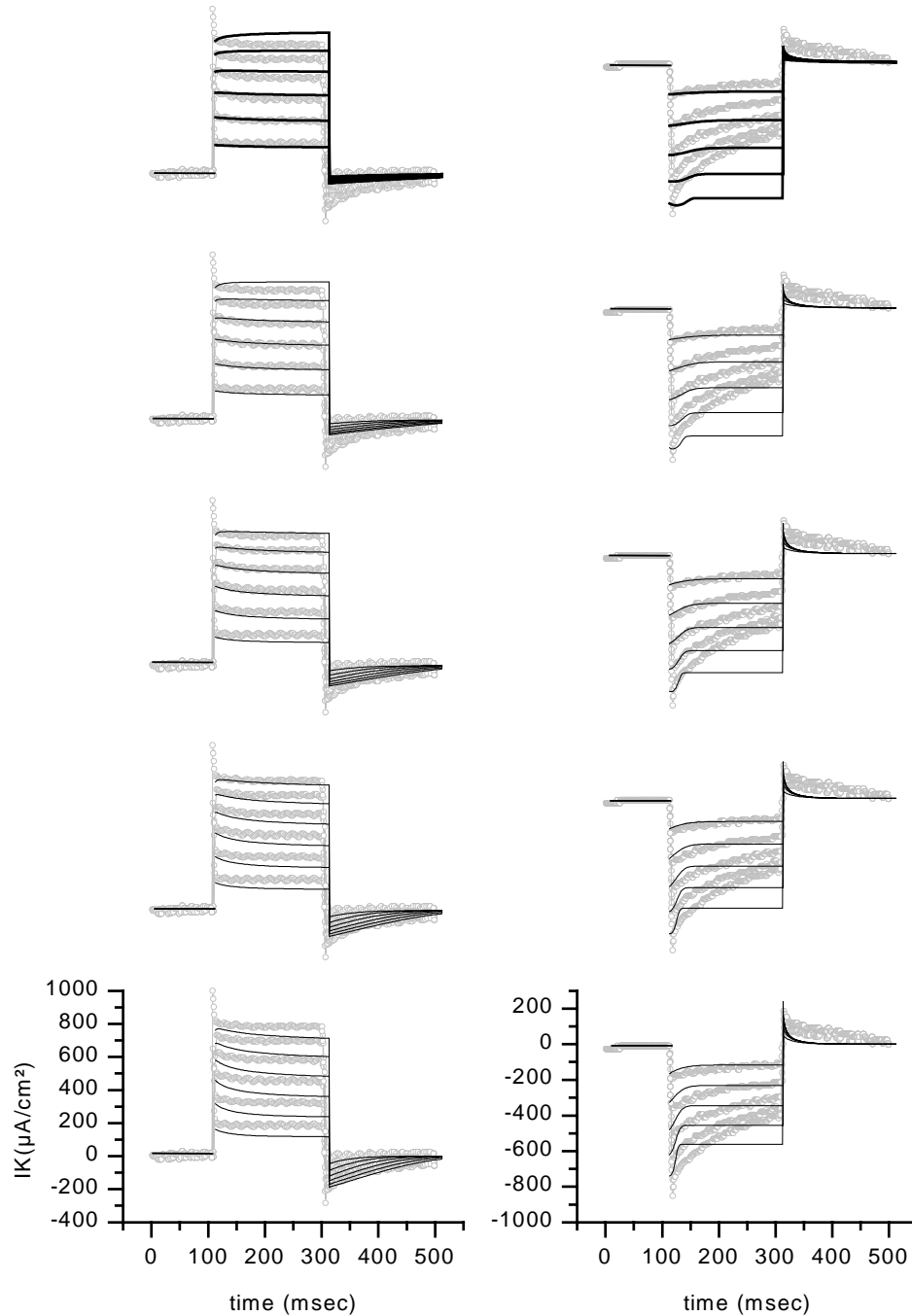
Interessanterweise wird bei einer scheinbaren Vergrößerung des TTS-Volumens der zeitliche Verlauf annähernd korrekt simuliert. Die zu niedrige Anfangsamplitude resultiert aus Gleichung (87) und wurde auch in einer Arbeit von Levis et al. (1986) beschrieben.

#### 4. Zweite Näherung: Variation von $\vartheta$ zur Untersuchung der Verteilung der $K_{ATP}$ -Kanaldichte

Bei der genaueren Untersuchung der Stromamplituden im Allgemeinen und der *Tail-currents* im Speziellen fällt auf, daß die berechneten *Tail-currents* eine zu große Amplitude im Vergleich zu den Messungen aufweisen. Diese zu große Amplitude wird von einer „zu stark“ berechneten Konzentrationsänderung verursacht.

In einem weiteren Schritt („zweite Näherung“) wurde daher die Leitfähigkeit im TTS im Vergleich zur Leitfähigkeit der „scheinbaren“ Oberflächenmembran variiert (siehe Abschnitt III.B.8 im Kapitel MATERIAL UND METHODEN).

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der Simulation für Werte von  $\vartheta = 20\%$  bis  $\vartheta = 60\%$  dargestellt.



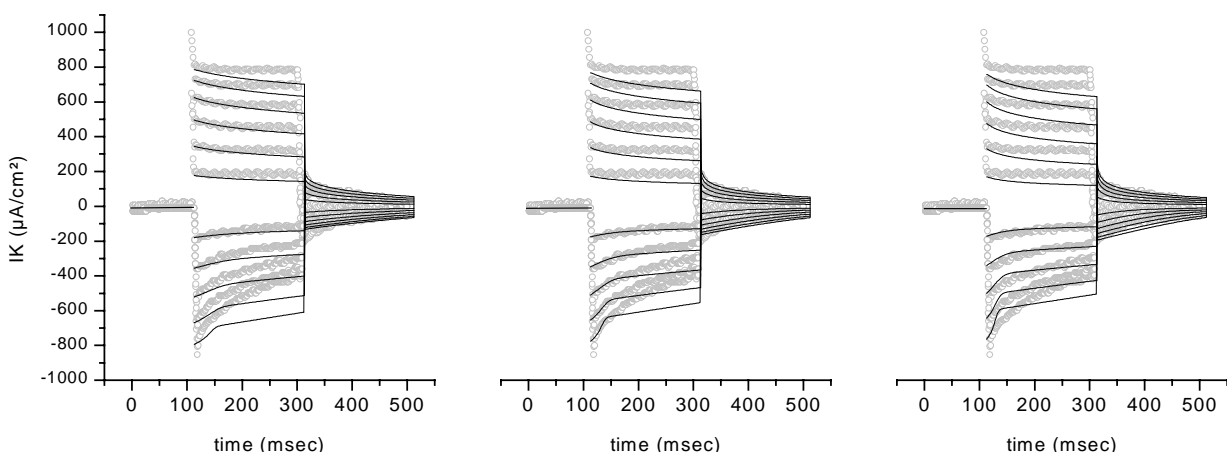
**Abbildung 64** Verbesserung der Übereinstimmung der Simulation (Linien) der  $K^+$ -Ströme für eine variable Kanaldichte  $\vartheta$  im TTS im Vergleich mit der Messung (offene Kreise) der  $K^+$ -Ströme. Oben:  $\vartheta = 20\%$ , unten  $\vartheta = 60\%$ . Inkrement: 10%.

Die beste Übereinstimmung bei der Analyse der initialen Stromkomponente (50 msec) wurde mit einem  $\vartheta = 40\%$  erzielt. Obwohl der erste Eindruck beim Betrachten der *Tail-currents* in Abbildung 64 für depolarisierende Pulse ein  $\vartheta = 60\%$  nahelegt, wird bei einer genaueren Betrachtung der Ströme für hyperpolarisierende Pulse eine zu rasche Abnahme (d.h. ein zu starker Einfluß der Konzentrationsänderung) beobachtet.

Bei der vollständigen Analyse der Amplitude und der Kinetik der *Tail-currents* war daher eine zusätzliche Berücksichtigung einer geringen Konzentrationsänderung an der ASM-Membran erforderlich. Durch diese Maßnahme wird eine zusätzliche langsamere Komponente hinzugefügt.

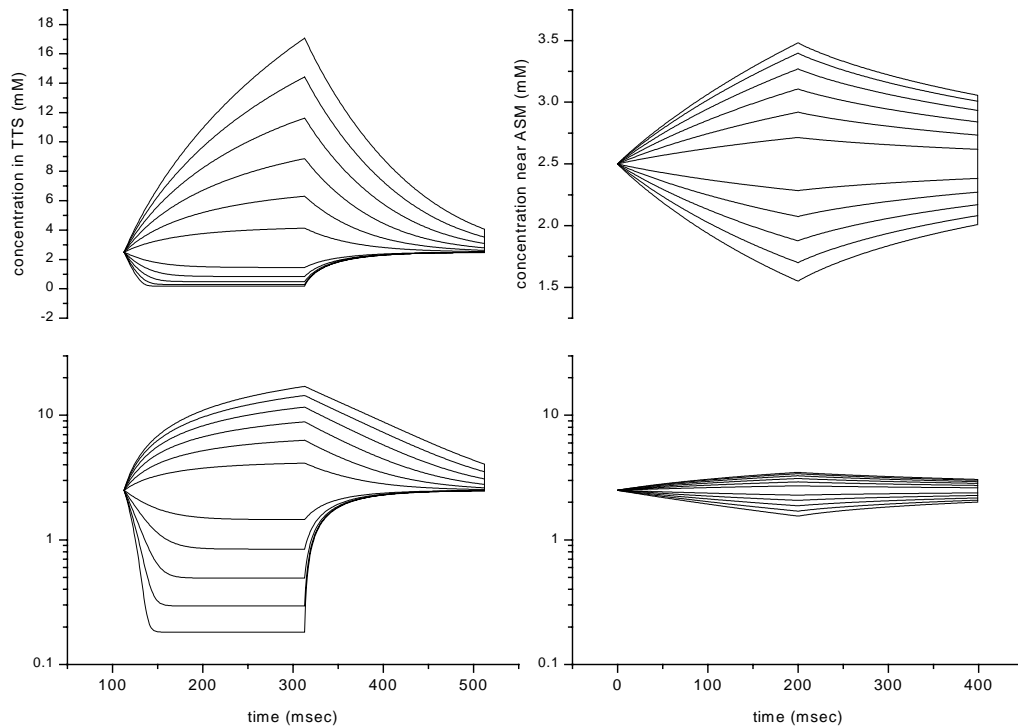
### 5. Dritte Näherung: Konstantes $\rho$ und zusätzliche Konzentrationsänderung in der Nähe der „scheinbaren“ Oberflächenmembran (ASM)

In einer Erweiterung der Simulation („dritte Näherung“) wurde der variable Anteil des „verarmten“ Volumens aus Abschnitt 3 in zwei Bereiche aufgeteilt: das TTS-Volumen ( $\rho = 0.4\%$ ) und ein zusätzliches Volumen in der Nähe der Oberflächenmembran. Dies ist in der folgenden Abbildung getrennt für Konzentrationsänderungen bei Stromfluß durch die TTS-Membran und durch die ASM Membran gezeigt. Grundlage für die Berechnung war eine verminderte Kanaldichte im TTS von einerseits  $\vartheta = 20\%$  (Links),  $\vartheta = 30\%$  (Mitte) und von  $\vartheta = 40\%$  (Rechts). Je nach gewählter Dicke des „verarmten“ Volumens in der Nähe der ASM-Membran lassen sich die Werte rechtfertigen (siehe auch DISKUSSION)



**Abbildung 65** Getrennte Untersuchung einer zusätzlichen Konzentrationsänderung an der ASM-Membran. Simulation (Linien) und Vergleich mit der Messung (offene Kreise) der  $K^+$ -Ströme für eine Kanaldichte von  $\vartheta = 20$  (Links)  $\vartheta = 30$  (Mitte) und  $\vartheta = 40\%$  (Rechts).

Die resultierende Konzentrationsverteilung im TTS (links) und in der Nähe der „scheinbaren“ Oberflächenmembran (rechts) ist in der folgenden Abbildung für ein  $\vartheta = 30\%$  gezeigt. Im unteren Teil ist eine logarithmische Darstellung gewählt, um die Änderungen bei starken Hyperpolarisation besser auflösen zu können.



**Abbildung 66:** Resultierende Konzentration im TTS (links) und in der Nähe der ASM-Membran (rechts). Im unteren Teil wurde eine logarithmische Darstellung gewählt.

## 6. Weitere Stromkomponenten

Die Abweichungen im Stromverlauf der Simulation von den Verläufen der Messung können durch die Einführung zusätzlicher Komponenten erklärt werden.

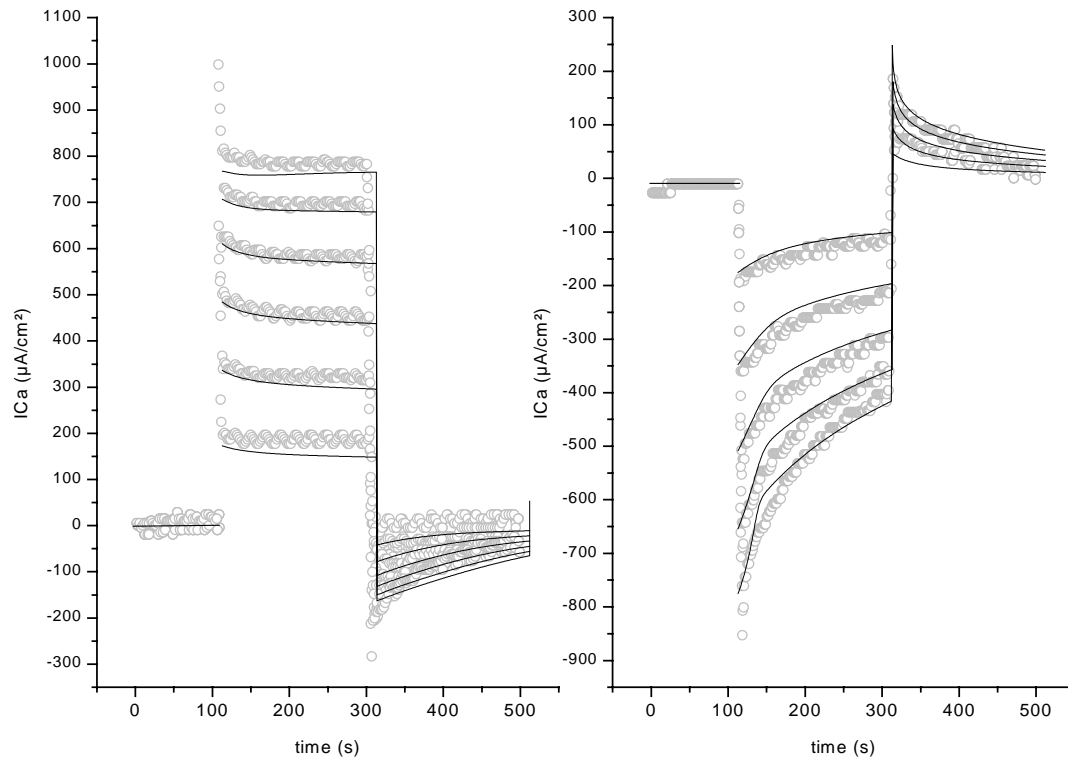
Die fehlende inaktivierende Komponente bei der Hyperpolarisation wird durch eine zusätzliche inaktivierende Stromkomponente durch die Oberflächenmembran berücksichtigt. Diese Komponente wurde z.B. in der Arbeit von Almers (1972 a, b) bei starken Hyperpolarisationen beobachtet und in einer Arbeit von Wallinga et al. (1999) parametrisiert.

Der zu starke Abfall der berechneten Ströme bei depolarisierenden Spannungspulsen wird durch eine langsam aktivierende Stromkomponente ausgeglichen. Das zugrundeliegende



Prinzip ist in Abschnitt E im Kapitel MATERIAL UND METHODEN dargestellt. Es handelt sich dabei um den Strom durch den *Delayed Rectifier*, dessen Beitrag zum Gesamtstrom auch bei einer metabolisch erschöpften Faser nicht vernachlässigt werden kann.

Unter Berücksichtigung dieser Komponenten ergibt sich der folgende Stromverlauf für die Simulation (Linie) im Vergleich zu den Meßwerten (Symbole).

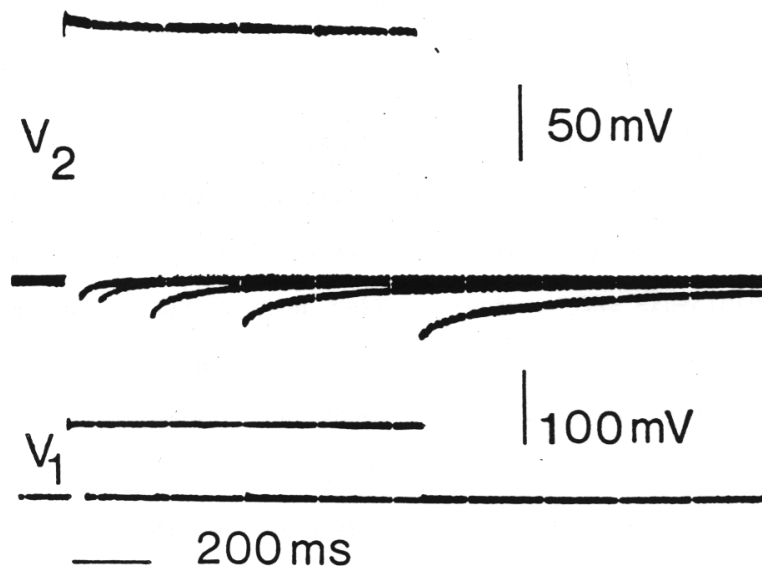


**Abbildung 67** Sehr gute Übereinstimmung der Simulation (Linien) mit den Messungen (Symbole) durch zusätzliche Stromkomponenten: Inaktivierung bei Depolarisation und zusätzlicher Strom durch den *Delayed Rectifier* bei Depolarisation.  $\vartheta = 30$  (Mitte) und  $\vartheta = 40\%$  (Rechts).

Dabei wurde eine Zeitkonstante zwischen 140 ms und 100 ms für die Aktivierung des Stroms durch den *Delayed Rectifier* gewählt, mit einer Leitfähigkeit von 1.8 mS/cm<sup>2</sup> und eine inaktivierende Zeitkonstante von 200 msec für eine zeitliche Inaktivierung bei starken Hyperpolarisationen. Eine ausführlichere Beschreibung der zusätzlichen Komponenten findet sich im Kapitel MATERIAL UND METHODEN sowie im und Kapitel DISKUSSION.

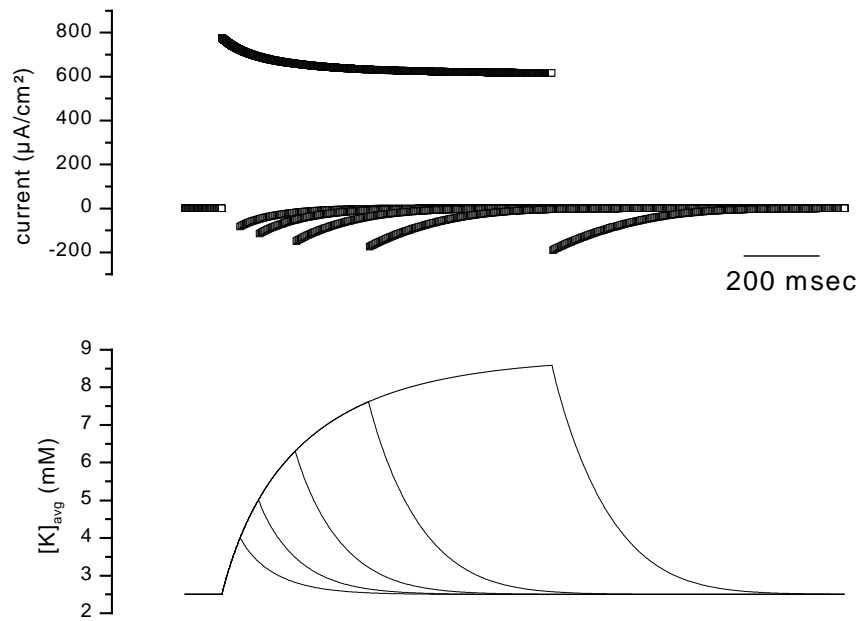
## 7. Getrennte Untersuchung der *Tail-currents* bei unterschiedlicher Depolarisationsdauer

Im Weiteren wurde eine Untersuchung für unterschiedliche Depolarisationsdauern durchgeführt. In der folgenden Abbildung sind die experimentellen Spannungen ( $V_1$  und  $V_2$ ) aufgetragen.



**Abbildung 68:** Getrennte Untersuchung der Tailcurrents bei unterschiedlicher Depolarisationsdauer. Messung mit der 3-MVC Methode (Fink & Wettwer, unpublizierte Daten).

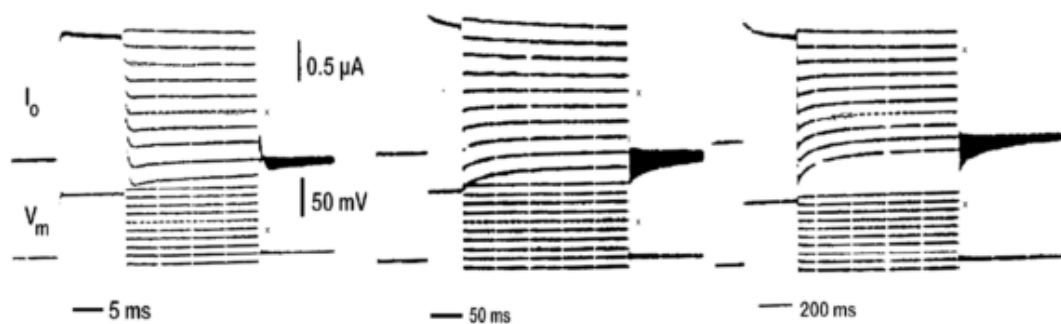
Die Ergebnisse der Simulation sind in der nächsten Abbildung dargestellt. Es wird wiederum gezeigt, daß die experimentellen Ergebnisse mit Hilfe der Konzentrationsänderungen im TTS erklärt werden können.



**Abbildung 69:** Simulation der Tailcurrents bei unterschiedlicher Depolarisationsdauer. Oben: Ströme, Unten: Berechnete Konzentration im TTS.

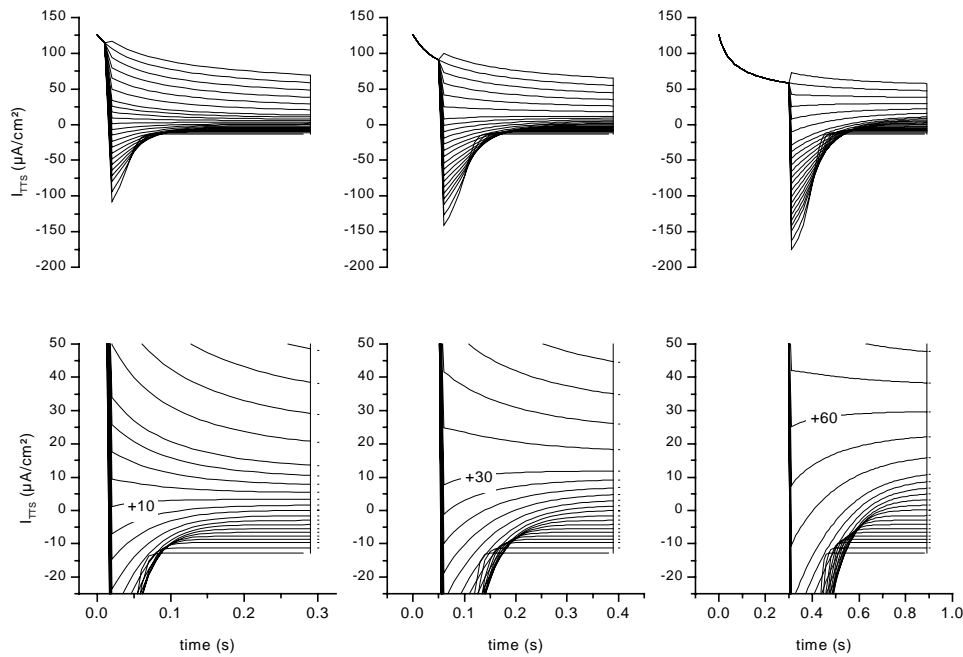
## 8. Vorpulse zur Bestimmung des Umkehrpotentials

Das Prepuls-Protokoll dient dazu, die Verschiebung des Umkehrpotentials nach unterschiedlich langen depolarisierenden Vorpulsen ( $V = 0$  mV) zu untersuchen. Dabei kann man indirekt durch Einsetzen des neuen Umkehrpotentials in die GHK-Spannungsgleichung auf eine Konzentrationsänderung schließen.



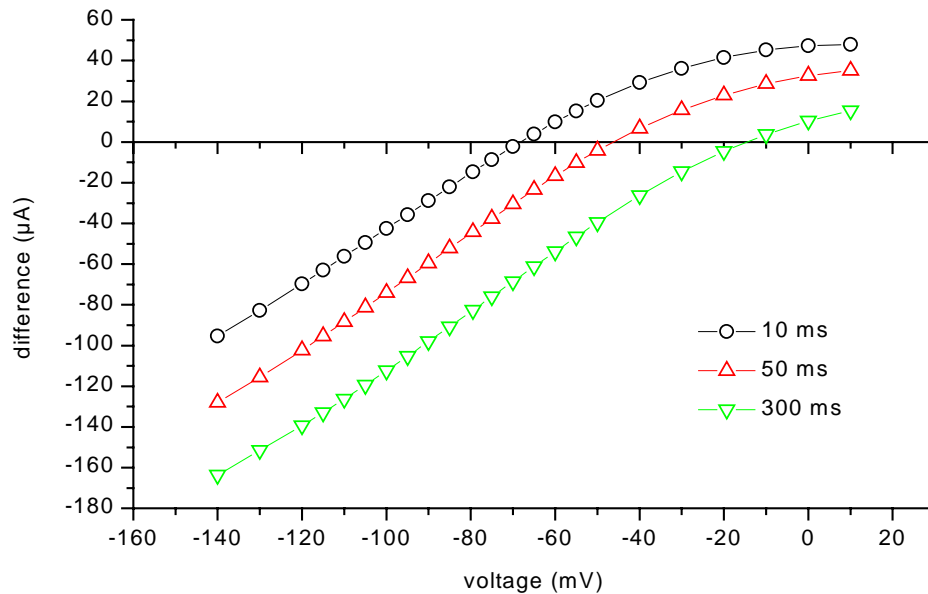
**Abbildung 70:** Messung der Tailcurrents bei unterschiedlicher Prepulsdauer. Oben ist die Spannung V2, unten die Kontrollspannung V1 aufgetragen- (Fink und Wettwer, unpublizierte Daten).

Die Simulationen für unterschiedliche Vorpulse von 10 msec, 50 msec und 300 msec Dauer sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 71:** Simulation der Tailcurrents bei unterschiedlicher Prepulsdauer. Oben: Ströme im TTS, Unten: Vergrößerte Skala.

Beim Auftragen der Differenz zwischen instantanem Strom und *steady state* Strom gegen die Spannung gibt der Vorzeichenwechsel der Stromdifferenz (instantaner Strom minus Strom nach ca 300 msec) das neue Umkehrpotential an. Für Prepulse von 10, 50 und 300 msec ergibt die Simulation folgendes Ergebnis:

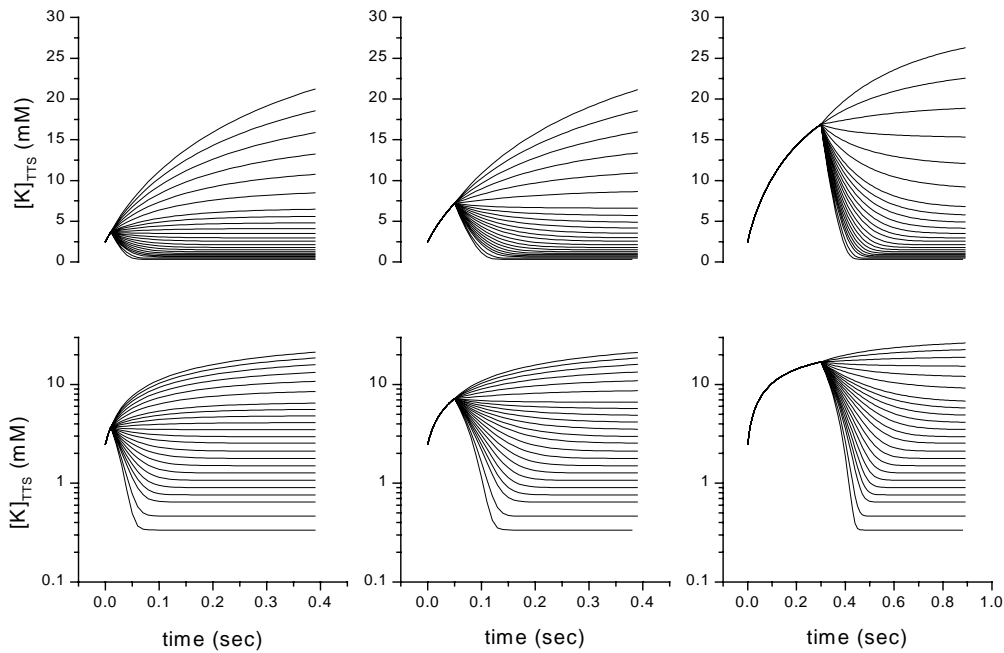


**Abbildung 72:** Differenzen der Anfangsamplitude und der Amplitude im "steady-state" der Tailcurrents bei unterschiedlicher Prepulsdauer. Krise: 10 msec, Dreieck nach oben: 50 msec, Dreieck nach unten: 300 msec Prepuls.

Dabei ergeben sich folgende Werte:

Vorpulsdauer	Berechnete Konzentration	Graphische Bestimmung Simulation
10 msec	3.7 mM	-68 mV
50 msec	7.2 mM	-45 mV
300 msec	16.9 mM	-16 mV

Die zugrundeliegenden simulierten Konzentrationsverläufe sehen wie folgt aus:

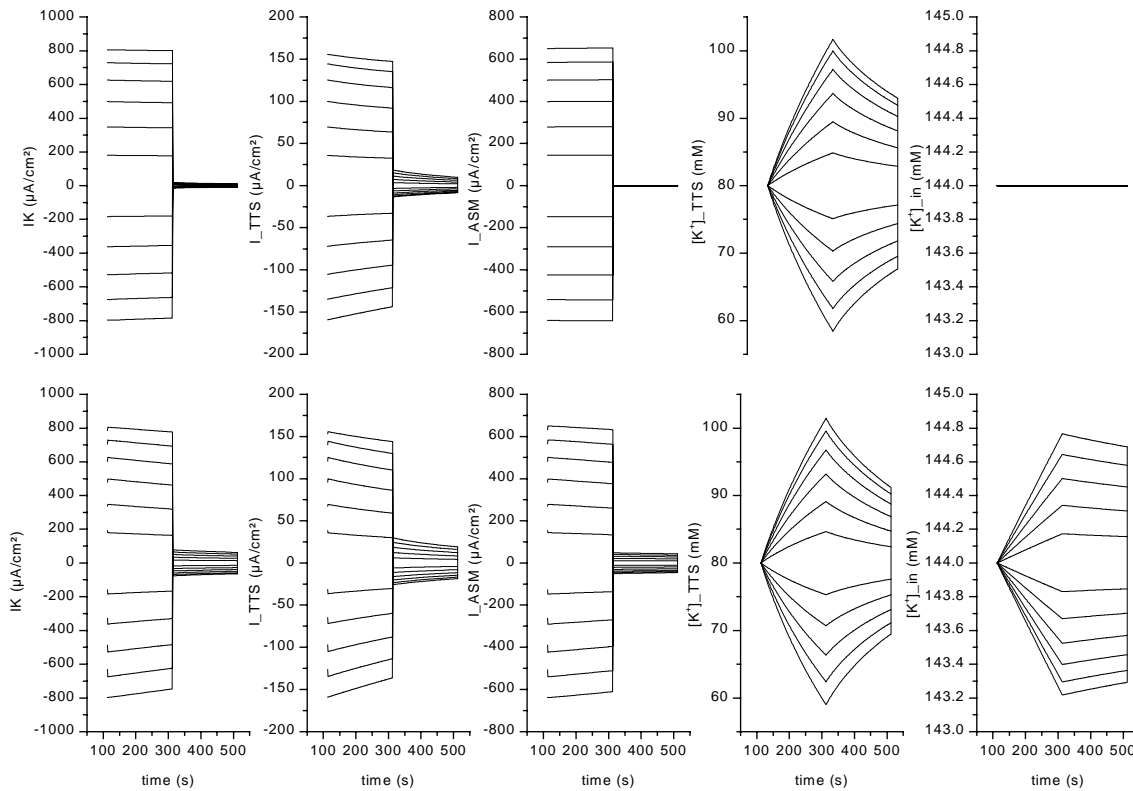


**Abbildung 73:** Simulation der Ströme und Konzentrationen für eine initiale extrazelluläre Kaliumkonzentration von 80 mM. Oben: ohne Änderung der intrazellulären Konzentration, unten: mit Änderung.

## 9. Einfluß der initialen extrazellulären $K^+$ -Konzentration

Schließlich wurde noch der Einfluß der initialen extrazellulären Kaliumkonzentration untersucht. Dazu wurde eine Messung in 80 mM Kaliumlösung durchgeführt. Die Simulationsergebnisse sind in der folgenden Abbildung für eine relative Kanaldichte der  $K_{ATP}$  Kanäle im TTS von  $\vartheta = 30\%$  dargestellt. Oben ist der Verlauf ohne intrazelluläre Konzentrationsänderung gezeigt, unten mit intrazellulärer Konzentrationsänderung.

Von links nach rechts sind dargestellt: Der Gesamtstrom  $I_K$ , der Strom  $I_{TTS}$  durch die TTS-Membran, der Strom  $I_{ASM}$  durch die ASM-Membran, die Konzentration  $[K^+]_{TTS}$  im TTS und die intrazelluläre Konzentration  $[K^+]_{in}$ .



**Abbildung 74:** Simulation der Ströme und Konzentrationen für eine initiale extrazelluläre Kaliumkonzentration von 80 mM. Oben: ohne Änderung der intrazellulären Konzentration, unten: mit Änderung.

## 10. Intrazelluläre $K^+$ -Konzentrationsänderung

In den Simulation wurde zusätzlich zur Konzentrationsänderung im TTS und an der ASM-Membran auch die durch den Strom hervorgerufene Änderung der intrazellulären Konzentration berücksichtigt. Die Unterschiede sind für kleinere Stromdichten quasi vernachlässigbar. Aufgrund der hohen initialen intrazellulären Kaliumkonzentration ( $[K]_i=140$  mM) hat eine Änderung der intrazellulären Konzentration auf 130 mM (entspricht einer Änderung von ca. 8%) nur einen relativ geringen Effekt. Die extrazelluläre Konzentration steigt dabei im TTS von 2.5 mM auf 16 mM an und trägt somit wesentlich stärker zum *Depletion*- bzw. *Accumulation*-Effekt bei (siehe DISKUSSION).





## V. Diskussion

Bei der experimentellen Untersuchung der langsamen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme (L-Type  $\text{I}_{\text{Ca}}$ ) unter *Voltage-Clamp* Bedingungen am Skelettmuskel wurde festgestellt, daß die “Inaktivierung” bzw. die Abnahme der Amplitude bei Messungen in physiologischer, isotoner  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung bis zu drei mal schneller ist als bei Messungen in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -gepufferten Lösung (Friedrich, Ehmer und Fink, 1999). Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob dieser Unterschied mit Hilfe der massiven Konzentrationsänderungen erklärt werden kann, die in Kompartimenten auftreten, bei denen nur ein sehr geringer Ionenaustausch mit der Badlösung möglich ist, wie z.B. im transversalen tubulären System (TTS).

Da bis dato die direkte experimentelle quantitative Untersuchung solcher Fluktuationen der Ionenkonzentration noch nicht möglich ist (Egelmann und Montague, 1999; Zoghbi et al., 2000), mußte eine neue Methode zur theoretischen bzw. numerischen Untersuchung experimentell erfassbarer Daten entwickelt werden.

### **1. $\text{Ca}^{2+}$ -Strom Messungen von Einzelfasern des *M. interosseus* der BALB/c Maus, Simulation der Konzentrationsverteilung und deren Auswirkungen auf den Stromverlauf**

Mit Hilfe dieser neu entwickelten Methode, die elektrophysiologische Messung, mathematische Modellierung und numerische Analyse kombiniert, ist es möglich, Ionenkonzentrationsänderungen im TTS direkt zu berechnen und deren Einfluß auf den Zeitverlauf des langsamen aktivierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms (L-Type  $\text{I}_{\text{Ca}}$ ) zu quantifizieren. Für eine repräsentative Einzelfaser des Säugerskelettmuskels wurde gezeigt, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im TTS unter *Voltage-Clamp* Bedingungen bis auf einen Wert von nur 3% des Ursprungswertes abfällt.

Die direkte quantitative Analyse wurde durch die Tatsache ermöglicht, daß nahezu der gesamte  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom durch die TTS-Membran fließt (Almers, Fink und Pallade, 1981), somit konnte der experimentell in extrazellulär gepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung aufgenommene Strom als

Simulationseingabe zur Berechnung (i) der zeitlichen Entwicklung der Konzentrationsänderungen im TTS und (ii) der resultierenden Ströme benutzt werden, die direkt mit Messungen in ungepufferter isotoner  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung verglichen wurden.

Obwohl bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Strommessungen auch bei Membranpotentialen oberhalb von etwa +50 mV Auswärtsströme beobachtet werden, kann es sich hierbei nicht um  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme handeln, da der Konzentrationsgradient gegen einen solchen Ausstrom bei Spannungen unterhalb des Nernst-Potentials ( $E_{\text{Ca}} = +144$  mV bei  $[\text{Ca}^{2+}]_o = 10$  mM) spricht. Vielmehr werden hierbei wiederum Kaliumströme durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal beobachtet, da das intrazelluläre Kalium aufgrund der enormen treibenden Kraft durch den bei diesen Spannungen offenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ausströmen kann (Hille, 1992; Jafri, 1998).

## **2. Simulation des $\text{K}^+$ -Stroms und Vergleich mit experimentellen Daten von erschöpften Fasern des *M. semitendinosus* des Frosches *Rana temporaria*.**

Bei der Untersuchung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen wird nur eine Abnahme der Ionenkonzentration im TTS beobachtet. Zur Untersuchung von Konzentrationsanreicherungen im TTS wurde der  $\text{K}^+$ -Strom von erschöpften Froschfasern anhand von Messungen von Wettwer und Fink (bisher unpublizierte Daten, siehe auch Ehmer, Wettwer, Fink, 2000) berechnet. Durch die metabolische Erschöpfung kommt es zu einem starken Anstieg der Kaliumleitfähigkeit der Membran und dadurch zu einem erhöhten Ausstrom von Kalium aus dem Faserinneren (siehe z.B. Fink und Lüttgau 1976). Dieser Anstieg wird (i) durch eine ATP-abhängige Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen (Krnjevic und Lisiewicz, 1972; Fink et al., 1983) und (ii) von einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der ATP-abhängigen Kaliumkanäle (Norma 1983; Spuce et al., 1985) hervorgerufen.

Die rasche Aktivierung und sehr langsame Inaktivierung des gemessenen Kaliumstroms an den erschöpften Froschfasern spricht für die Annahme, daß ein überwiegender Teil des Stroms durch den ATP-abhängigen Kaliumkanal ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) fließt, dessen allgemeine Eigenschaften in einem Review-Artikel von Stephen J. H. Ashcroft und Frances M. Ashcroft (1990) zusammengefaßt werden. Die Eigenschaften, die Regulation und die mögliche Funktion der ATP-abhängigen Kaliumkanäle von Muskelzellen werden in einem Review von Davies et al. (1991) vorgestellt.

### 3. Untersuchung der $K_{ATP}$ -Kanaldichte im TTS des *M. semitendinosus* des Frosches *Rana temporaria*

Die Kanaldichte der  $K_{ATP}$ -Kanäle ist relativ hoch, es wird vermutet, daß die Kanäle mit zu den häufigsten Kaliumkanälen im Sarkolemma zählen (Davies et al., 1991). Die meisten Erkenntnisse stammen aus Einzelkanaluntersuchungen, bei denen die Fläche des *Patches* nicht exakt quantifiziert werden kann. In Vesikeln aus Skelettmuskelmembran wurden in allen *Patches* mindestens ein Kanal gefunden (Standen et al., 1984). Spuce et al. (1985) geben eine mittlere Dichte von 3.6 Kanälen pro Patch an, in etwa gleich der Dichte der spannungsabhängigen *Delayed Rectifier* Kanäle (Standen et al., 1985), d. h. „einige Kanäle pro  $\mu\text{m}^2$ “. Diese Abschätzung ist konsistent mit den frühen Beobachtungen von Fink und Lüttgau an metabolisch erschöpften Fasern (1976) und gleich der maximalen Leitfähigkeit durch spannungsabhängige Kaliumkanäle bei Depolarisation (Adrian et al., 1970; Stanfield, 1970).

In einer Arbeit über die Regulation von ATP-abhängigen Kaliumkanäle schlagen Parent und Coronado (1989) vor, daß die Kanäle in der TTS Membran Unterschiede im Vergleich zu den Kanälen der „scheinbaren“ Oberflächenmembran (ASM-Membran) aufweisen (siehe auch Neumcke und Weik, 1990).

Anhand des Vergleichs von Simulation und Messung konnte zum ersten Mal eine quantitative Abschätzung über die Verteilung der Leitfähigkeit im TTS und in der „scheinbaren“ Oberflächenmembran (d. h. die Oberflächenmembran der Zelle ohne die TTS-Membran) getroffen werden. Der ermittelte Wertebereich wird weiter unten diskutiert.

Bei der Ermittlung der Kanaldichte mußte berücksichtigt werden, daß die experimentell gemessenen Ströme nicht ausschließlich durch den  $K_{ATP}$ -Kanal fließen sondern auch Komponenten anderer spannungsabhängiger Kaliumkanäle mit beinhalten (z.B. den *Delayed Rectifier* und den *inward rectifier*). Zur Berechnung der Kanaldichte wurde daher eine genaue Untersuchung der *Tail-currents* durchgeführt, da diese "Schwanz"-Ströme nur durch die Änderung der Kaliumkonzentration entstehen, die wiederum hauptsächlich im TTS erwartet wird.

### 4. Begründung der Wahl zugunsten des Scheibemodells von Adrian

Obwohl bereits viele unterschiedliche experimentelle Methoden und detaillierte mathematische Modelle zur Untersuchungen der elektrischen Eigenschaften des Skelettmuskels und des TTS vorgeschlagen wurden (Boyle und Conway, 1941; Katz, 1949; Falk und Fatt, 1964; Fatt, 1964; Peachey, 1965; Endo, 1966; Horowicz et al., 1968; Gage und Eisenberg, 1969; Eisenberg und Gage, 1969; Cole, 1972; Valdiosera et al., 1974a,b; Eisenberg et al., 1977; Mathias et al., 1977; Mathias et al., 1980; Dulhunty, 1982; Levis et al., 1983) existierte bis

dato immer noch ein Mangel an quantitativen Aussagen über die zeitlichen und räumlichen Konzentrationsänderungen die durch Ionenströme hervorgerufen werden. Weiterhin existieren auch viele sehr detaillierte Untersuchungen der gesamten TTS-Struktur, siehe z.B. Peachey und Franzini-Armstrong (1983) als Übersicht (mit 328 Referenzen), Ashcroft et al. (1985) und Amsellem et al. (1995) und unterschiedliche Modelle zu deren mathematischer Beschreibung, siehe z.B. die Review-Artikel von Brenda R. Eisenberg (1983, mit 339 Referenzen), Robert S. Eisenberg (1983, mit 105 Referenzen) und Richard H. Adrian (1983, mit 116 Referenzen) als Übersicht.

Nachdem in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf dem Ionenstrom und den hervorgerufenen Konzentrationsänderungen lag, wurde auf das von Adrian et al. (1969 a,b) vorgeschlagene und von Barry und Adrian (1973) weiterentwickelte Scheibenmodell zur Beschreibung des TTS zurückgegriffen.

Die zeitliche Entwicklung der Wirkung des Puffers auf den Zeitverlauf der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme lieferte einen weiteren Hinweis auf die Korrektheit der Wahl des Scheibenmodells zur Beschreibung der Depletion-Theorie. Die vorgestellten Untersuchungen zeigten deutlich, daß die „Inaktivierung“ bzw. die Abnahme der Stromamplitude mit dem Lösungswechsel von ungepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung auf extrazellulär gepufferte  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung langsamer ausfällt. Noch deutlicher wurde der Effekt bei tieferen Temperaturen sichtbar, bei denen die intrinsische Inaktivierungskinetik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle extrem verlangsamt ist. Aufgrund der insgesamt erniedrigten Membranleitfähigkeit bei niedrigeren Temperaturen ist die Güte der Spannungs-kontrolle an den Faserenden nochmals erhöht, wodurch die Hypothese einer gleichmäßig depolarisierten Faser über die gesamte Faserlänge noch besser erfüllt ist.

## **5. Auswahl und Wert der relevanten Parameter im Vergleich mit Literaturwerten**

### **a) $\text{Ca}^{2+}$**

#### **Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit:**

Um die Spannungsabhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom Aktivierung (bzw. der Aktivierung der L-Type  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) zu beschreiben, wurde auf unterschiedliche Modelle zurückgegriffen, die allesamt auf der Boltzmannfunktion basieren: (i) ein Modell von Dietze et al. (1997) für Skelett Myotuben, (ii) von Wang, Messi und Delbono (1999) für ausdifferenzierte

Skelettmuskelfasern und (iii) von Jafri et al. (1998) für Herzzellen. Die Modelle unterscheiden sich in ihrer resultierenden Strom-Spannungskennlinie im untersuchten Membranspannungsbereich von  $-80$  mV bis  $+60$  mV nur unwesentlich, somit ist es nicht verwunderlich, daß die simulierten Daten für jedes benutzte Modell mit den experimentellen Daten übereinstimmen.

Die Werte für den Eingangswiderstand  $r_s$  und für das Volumenverhältnis  $\rho$  von TTS-Volumen zum Volumen der gesamten Faser wurden „experimentell“ bestimmt, d. h. die Werte wurden so lange angepaßt, bis eine gute Übereinstimmung von simuliertem Strom  $I_{sim}^{unbuf}(t)$  mit experimentellem Strom  $I_{exp}^{unbuf}(t)$  resultierte.

### **Anteil $\rho$ des TTS-Volumens am Gesamtfaservolumen**

Der ermittelte Wertebereich von  $\rho=0.4\%$  bis  $\rho=0.6\%$  ist in relativ guter Übereinstimmung mit experimentell bestimmten Daten aus Ultrastruktur-Untersuchungen:  $\rho=0.4\%$  für Maus-EDL,  $\rho=0.22$  für Maus-Soleus (Luff et al., 1971; siehe auch Tabelle 2 im Kapitel GRUNDLAGEN). In anderen Arbeiten wurde der Bruchteil ebenfalls zu  $\rho = (0.4 \pm 0.05)\%$  (Almers et al., 1981) bestimmt.

Zur Erklärung der Abweichung zu etwas höheren Werten können die folgenden Argumente herangezogen werden:

- (i) Die untersuchten Einzelfasern des *M. interosseus* wurden noch nicht mit ultrastrukturellen Methoden untersucht. Somit ist es durchaus möglich, daß der ermittelte Wertebereich korrekt ist. Weiterhin könnten individuelle Unterschiede in der Morphologie auftreten, so daß bei einzelnen Tieren die morphologischen Parameter vom Mittelwert abweichen. Hinweise darauf geben Eisenberg und Kuda (1976), die eine Standardabweichung individueller Fasern von 30% angeben. Die Abweichung deutet entweder auf große individuelle Streuung oder experimentelle Meßfehler hin.
- (ii) Bei der experimentellen ultrastrukturellen Untersuchung wurden immer nur ausgewählte Schnitte ausgewertet. Somit könnte der ultrastrukturell rekonstruierte Wert fehlerbehaftet sein. Möglicherweise wurde auch bei der Anfärbung des TTS keine vollständige Färbung erzielt, was ebenfalls in einem scheinbar geringeren Volumenanteil des TTS resultieren würde.

- (iii) Die in der Simulation ermittelten Werte beinhalten auch eine Verarmung von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ , das nicht im TTS verarmt wurde. Solche scheinbaren Vergrößerungen wurden bei den Simulationen von  $\text{K}^+$ -Strömen beobachtet, wo der Volumenanteil auf einen 10fach erhöhten Wert von scheinbar 6% anwachsen kann. Obwohl bisher vermutet wurde, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit der Skelettmuskelfaser ausschließlich im TTS lokalisiert ist (Almers et al., 1981), könnte dennoch ein sehr kleiner Teil des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms durch die Oberflächenmembran (nicht TTS-Membran) geflossen sein. Gründe dafür könnten sein:
- eine geringe Dichte von L-Type DHP Kanälen an der „apparent area“ (d.h. Oberflächenmembran ohne TTS-Membran). Anhand von unterschiedlichen Messungen (siehe z. B. Almers et al., 1981) wurde eine maximale prozentuale Leitfähigkeit von 7.4% der „apparent area“ ermittelt, die den höheren Wert nicht vollständig erklären kann.
  - Durch das Einführen der intrazellulären Mikroelektroden wurden minimale Verletzungen der Membran verursacht, ein kleiner Teil des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms kann durch diese unspezifischen Löcher fließen.
  - eine unspezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit der Oberflächenmembran durch diverse, z.T. möglicherweise noch nicht klassifizierte Kanäle oder Restleitfähigkeiten bereits klassifizierter Kanäle für  $\text{Ca}^{2+}$ , wie z.B. den spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanal (siehe z.B. Campbell, 1976; Gissel und Clausen, 1999; Santana et al., 1998).

Sehr wahrscheinlich trifft eine Kombination aus allen Argumenten zu. Für Argument (iii) spricht, daß der Wert bei einer niedrigeren Temperatur von 22°C bei  $\rho=0.4\%$  liegt, während der Wert bei 30°C bei  $\rho=0.6\%$  liegt. Hierbei kann nicht unterschieden werden, ob die Erhöhung an einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Restleitfähigkeit von  $\text{Na}^+$ -Kanälen liegt (die ebenfalls temperaturabhängig ansteigt), oder ob ein geringer Teil der DHP Kanäle auf der Oberflächenmembran lokalisiert ist. Eine mögliche Untersuchung wäre spezifisches Anfärben der DHP-Kanäle mit markierten Antikörpern und eine detaillierten ultrastrukturellen Untersuchung der „apparent area“, oder eine detaillierte Untersuchung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Membran-Nähe (was experimentell aber noch nicht möglich ist, siehe weiter unten).

### **Eingangswiderstand $r_s$**

Der numerische Wert des Eingangswiderstands  $r_s$  war der entscheidende Parameter um den simulierten Strom im „stationären Zustand“ an den experimentell bestimmten Wert

anzupassen. Die Werte im Bereich von  $r_s = 30 \text{ } \Omega\text{cm}^2$  bis  $r_s = 200 \text{ } \Omega\text{cm}^2$  sind ebenfalls in guter Übereinstimmung mit in der Literatur publizierten Werten. In einem Fall war eine Reduktion des Eingangswiderstands auf  $r_s = 0 \text{ } \Omega\text{cm}^2$  nötig, um den bestmöglichen Fit der Simulation an die Experimente zu erhalten. Dieser sehr niedrige Wert liegt etwas unterhalb der bisher beobachteten und publizierten Werte, die Abweichung wird auch weiter unten diskutiert.

Adrian und Peachey (1973) gaben einen Wert von  $r_s = 150 \text{ } \Omega\text{cm}^2$  für eine Frosch *sartorius* Muskelfaser bei der Rekonstruktion eines Aktionspotentials an. Valdiosera et al. (1974b) und Mathias et al. (1977) erhalten von Impedanzmessungen an Frosch Muskelfasern Werte zwischen  $r_s = 20 \text{ } \Omega\text{cm}^2$  und  $r_s = 130 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ . In einer vor Kurzem veröffentlichten Arbeit von Kim und Vergara (1998a) berechneten die Autoren in einer Studie über die Potentialverteilung im TTS beim Anlegen von „überladenden“ Spannungspulsen („*Supercharging*“, Kim und Vergara, 1998b) für Fasern des *M. semitendinosus* des Frosches einen Wert im Bereich von  $r_s = 110 - 150 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ . Der von Heiny et al. (1985) anhand von Absorptionsmessungen von potentiometrischen Fluoreszenzfarbstoffen ermittelte Wertebereich von  $r_s = 20 \text{ } \Omega\text{cm}^2$  bis  $r_s = 50 \text{ } \Omega\text{cm}^2$  deckt den unteren Bereich ab. Der bis dato einzige in der Literatur veröffentlichte Wert für Säugermuskeln wurde von Simon und Beam (1985) mit Hilfe von „charge movement“ Messungen ermittelt und beträgt  $r_s = 60 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ .

Interessanterweise nehmen unter den gewählten experimentellen Bedingungen die in der Simulation ermittelten Werte für  $r_s$  mit steigender Depolarisation ab. Mögliche Gründe hierfür sind:

- i) Eine Änderung der Morphologie der Einzelfaser, die durch die stärkeren Kontraktionen bei hohen Depolarisationen hervorgerufen werden könnten (Friedrich, bisher nicht veröffentlichte Beobachtung). Durch diese Kontraktionen könnten strukturelle Veränderungen in der Oberflächenmembran hervorgerufen werden, die einen Einfluß auf die Öffnung der T-Tubuli zur Faseroberfläche verursachen und diese möglicherweise vergrößern.
- ii) Die niedrigeren Werte für  $r_s$  wurden benötigt um die negativeren Werte des *steady-state* Stroms zu beschreiben. Gründe, die ebenfalls einen negativeren *steady-state* Strom produzieren, ohne den Wert von  $r_s$  zu verkleinern sind:



- a) Eine Verkleinerung von  $f_T$  (siehe Abbildung 30). Eine solche Abnahme könnte einerseits durch ein Leck um die Pipettenspitze herum hervorgerufen werden, und andererseits auch durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme durch unspezifische Kanäle in der Oberflächenmembran.
- b) Eine Vergrößerung von  $\rho$  (siehe Abbildung 31), die durch eine stärkere Kontraktion bei stärkerer Depolarisation hervorgerufen wird.

Ein Argument, daß eher für eine Zunahme von  $r_S$  spricht, ist die höhere treibende Kraft für Kaliumionen bei zunehmend positiven Depolarisationen (das Ruhemembranpotential für Kalium liegt bei Raumtemperatur bei  $E_K = -100$  mV) durch die es zu einem stärkeren Ausstrom von Kaliumionen durch den DHP- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal kommt (Hille, 1992; Jafri et al., 1998). Der Anteil der Kaliumleitfähigkeit nimmt mit zunehmender Depolarisation zu, während gleichzeitig der Anteil des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms aufgrund der abnehmenden treibenden Kraft (das Ruhemembranpotential für Calcium bei Raumtemperatur ist  $E_{Ca} = +144$  mV) abnimmt. Daher ist dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei stärkeren Depolarisationen im stationären Zustand ein größerer Anteil von Kaliumausstrom überlagert. Dieser Anteil führt zu einer Verschiebung des Stroms im stationären Zustand zur positiveren Werten. Wie in den theoretischen Betrachtungen geschildert wurde, werden die positiveren Werte des Stroms im stationären Zustand durch eine Zunahme des Eingangswiderstands in der Simulation reproduziert (siehe Tabelle 7). Eine Verletzung der Oberflächenmembran in der direkten Umgebung der Mikroelektroden ruft einen ähnlichen Effekt hervor, denn durch das entstehende Loch könnten zusätzlich intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Ionen ausströmen. Ein Einstrom von  $\text{Cl}^-$  Ionen ist sehr unwahrscheinlich, da aufgrund der Lösungszusammenstellung quasi keine  $\text{Cl}^-$  Ionen im Extrazellulärmedium vorhanden sind. Obwohl die Mikroelektroden möglichst nahe am Zentrum der Faser eingestochen wurden (Friedrich et al., 1999), ist eine solche Membranverletzung nicht gänzlich auszuschließen.

Da die insgesamt sehr niedrige  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit durch den DHP Kanal (Argument (ii)) nur von 0.17% (bei  $-20$  mV) auf 0.75% der Gesamtleitfähigkeit (bei  $+20$  mV) ansteigt (Werte ermittelt nach McDonald et al., 1986; Jafri et al., 1998) spielt dieser geringe  $\text{K}^+$ -Strom durch den DHP Kanal nur eine untergeordnete Rolle und sollte sich auch nur in einer Erhöhung von weniger als  $1 \Omega\text{cm}^2$  bemerkbar machen.

b)  $\text{K}^+$

### **Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit**

Bei der experimentellen Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Kaliumströme an erschöpften Fasern des *M. semitendinosus* wurde ein quasi-linearer Strom-Spannungs-Zusammenhang gefunden, der mit Hilfe einer Boltzmannfunktion beschrieben werden konnte. Ein Vergleich mit in der Literatur veröffentlichten Daten zum  $K_{ATP}$ -Strom betätigt diese Hypothese (siehe auch Ashcroft und Ashcroft, 1990).

### **Anteil $\rho$ des von Konzentrationsänderungen betroffenen Volumens am Gesamtfaservolumen**

Bei der Untersuchung der effektiv verschobenen Ladung wurde eine Zunahme des "konzentrationsverarmten" Volumens von  $\rho = 0.0026$  bis  $\rho = 0.06$  festgestellt. Interessanterweise wurde der Stromverlauf bei den Simulationen auch mit einem modifizierten  $\rho$  annähernd korrekt vorhergesagt. Allerdings gibt es keinen Grund, der eine tatsächliche Vergrößerung des TTs-Volumens um das mehr als 20-fache erklären könnte. Vielmehr kommt es aufgrund der großen Ströme auch zu Konzentrationsänderungen in der Nähe der ASM-Membran. Das Volumenverhältnis  $\rho$  wurde daher in zwei Bereiche aufgeteilt. Dabei wurde der Bruchteil des TTS-Volumens am Gesamtfaservolumen mit  $\rho_{TTS} = 0.4 \%$  gewählt (siehe GRUNDLAGEN), zusätzlich wurde auch eine Konzentrationsänderung in der direkten Umgebung der „scheinbaren“ Oberflächenmembran zugelassen. Hierfür wurden die Bereiche berücksichtigt, die im direkten Kontakt mit der Badlösung standen.

Bei der Berechnung der Ströme fällt auf, daß der berechnete Effekt viel zu stark ausfällt. Dafür sprechen die folgenden Gründe:

- i) eine zu schnelle Kinetik
- ii) eine zu große Amplitude der *Tail-currents*.

Eine Lösung stellt eine verringerte TTS-Fläche bzw. ein verringertes Verhältnis von TTS-Fläche zur Gesamtfläche dar, d.h. eine Reduktion von  $f_T$ , wie in Abbildung 30 dargestellt. Allerdings sollten sich die Flächenverhältnisse bei einer metabolischen Erschöpfung der Faser nicht tatsächlich ändern. Vielmehr bietet sich als Lösungsansatz eine verringerte Leitfähigkeit durch eine verringerte Kanaldichte an (siehe auch Cannon et al., 1993; Fambrough et al., 1987; Wallinga et al., 1999).

Die weiterhin insgesamt zu niedrigen Amplituden resultieren aus der Gleichung zur Berechnung der TTS-Leitfähigkeit (siehe auch ERGEBNISSE) und wurden auch in einer Arbeit von Levis et al. (1983) beobachtet.

### **Anteil der $K_{ATP}$ -Kanaldichte im TTS: $20\% < \vartheta < 40\%$**

Wenn man das Membranflächenverhältnis von TTS-Membran zur „scheinbaren“ Oberflächenmembran (ASM-Membran) mit dem von Peachey und Adrian (1969) ermittelten Verhältnis von TTS:ASM = 2:1 annimmt, wurde eine effektiv erhöhte Leitfähigkeit der „scheinbaren“ Oberflächenmembran im Vergleich zur TTS-Membran festgestellt. Der Unterschied kann mit einer höheren Kanaldichte der  $K_{ATP}$  Kanäle auf der „scheinbaren“ Oberflächenmembran erklärt werden. Der Anteil der  $K_{ATP}$ -Kanaldichte im transversen tubulären System liegt im Bereich zwischen  $20\% < \vartheta < 40\%$  der  $K_{ATP}$ -Kanaldichte der ASM-Membran. Im Vergleich mit Kanaldichten im TTS im Vergleich zur ASM-Membran für den *Delayed Rectifier* von "etwa 20%" (Kirsch et al., 1977) bis 45% (Wallinga et al., 1999) liegt die berechnete  $K_{ATP}$  Kanaldichte in ähnlichen Bereichen.

### **Zusätzliche Stromkomponenten:**

Beim Vergleich der simulierten Ströme mit den Messungen fällt eine Abweichung bei Hyperpolarisation auf. Hier inaktiviert der gemessene Strom zusätzlich. Dieser Befund wurde von Almers (1972a,b) berichtet und in der Simulation mit einer Inaktivierung mit einer inaktivierenden Zeitkonstante von  $\tau = 200\text{ ms}$  bei einer Leitfähigkeit von  $2\text{ mS/cm}^2$

berücksichtigt (siehe auch Adrian et al., 1970; Wallinga et al., 1999). Bei Depolarisation wurde die mit Hilfe des Cole-Theorems berechnete Stromdichte mit den Simulationen verglichen. Hierbei wurde ein zu starker Effekt berechnet, der allerdings durch einen zusätzlichen, langsam aktivierenden Strom kompensiert werden kann (siehe auch MATERIAL UND METHODEN). Diese Komponente ist wahrscheinlich der Strom durch den *Delayed Rectifier* mit einer Aktivierungszeitkonstante von etwa 40 ms bis 120 ms und einer Leitfähigkeit von  $1.8 \text{ mS/cm}^2$ .

## 6. Konvergenz des Algorithmus, Rechenzeit und adaptive Fehlergrenzen

Bei der Wahl der Simulationsparameter Ringanzahl  $m$ , Schrittgröße  $\Delta t$ , maximaler Fehler `error`, maximale Anzahl der Iterationen `MAXIT` und des Bruchteils `quot` der Differenzbildung `zi-=di/quot` in der `current-finding` Subroutine mußte ein Verhältnis gewählt werden, bei dem einerseits die Konvergenz des Algorithmus gewährleistet war und andererseits die Rechenzeit bei der gewünschten Genauigkeit optimal genutzt wurde. Mit Hilfe der Routine der adaptiven Fehlergrenzen konnte eine möglichst hohe Genauigkeit erreicht werden. Die Routine erhöhte den maximal zulässigen Fehler `error` bei der Berechnung des radialen Stroms in der Fasermitte bei Überschreiten der Anzahl der Maximalen Iterationen um einen Faktor 10, um Oszillationen um den Nullpunkt abzufangen. Bei den Oszillationen pendelte der berechnete Wert zwischen einem positiven und einem negativen Wert zwischen +50% bis +600% um den maximal tolerierten Fehler. Sie traten aufgrund der endlichen Rechengenauigkeit auf (`float`, 32 bit Fließkomma). Eine Erweiterung auf 64 bit (`double`) und 80 bit (`long double`) brachte keine wesentliche Verbesserung.

Andererseits wurde der Fehler schrittweise reduziert, wenn eine Lösung bereits im ersten Iterationsschritt gefunden wurde. Somit war eine möglichst genaue Lösung des Algorithmus gewährleistet.

## 7. Stärken und Schwächen der neu entwickelten Methode

### Stärken:

Bei der Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms in gepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}$  werden alle Parameter (mit Ausnahme der zu untersuchenden Konzentrationsänderungen) die zur Beschreibung und Modellierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms notwendig sind für jede Faser direkt mit der Messung aufgenommen und individuell erfaßt.

Dabei entfällt die Suche nach „schwer berechenbaren“ oder auch nicht exakt quantifizierbaren Parametern, wie z.B. der orts- und zeitabhängigen Potentialverteilung über der kontrahierenden Muskelfaser ebenso wie die - aufgrund der Diversität und der individuellen Variation quasi nicht explizit quantifizierbare - radiale und zeitliche Entwicklung der Depolarisation im TTS. Der Einfluß unbekannter Leckleitfähigkeiten ist ebenso direkt in der Messung enthalten wie der mögliche Einfluß einer - durch den gemessenen Einstrom hervorgerufenen - intrazellulären Konzentrationsänderung auf das Kanalverhalten.

In herkömmlichen Ansätzen, die keine experimentellen Daten als Simulationseingabe benutzen, müssen zur vollständigen Beschreibung des Stroms alle Parameter getrennt modelliert werden, um einen anschließenden sinnvollen Vergleich der Simulation mit der Messung zu erlauben.

Die hier vorgestellte Methode bietet die Möglichkeit den Einfluß der extrazellulären Konzentration separat zu untersuchen und unabhängig von anderen Zusammenhängen zu quantifizieren.

Als Anwendungsbeispiel wurde die Untersuchung der Kanaldichteverteilung der  $\text{K}_{\text{ATP}}$  Kanäle gewählt. Aufgrund des Vergleichs der berechneten Ströme mit experimentellen Daten ist eine Aufschlüsselung des Gesamtstroms in die Komponenten  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -TTS-Strom,  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Oberflächenstrom und weiterer Stromkomponenten durch die Oberflächenmembran möglich.

Weiterhin bietet die Methode durch ihre universelle Anwendbarkeit die Möglichkeit vielfältige Fragestellungen zu untersuchen, bei denen Konzentrationsänderungen einen Einfluß auf das Verhalten des Systems haben und bei denen es gelingt ein Teilsystem zu messen (oder zu modellieren), bei dem diese Konzentrationsänderungen unter Laborbedingungen unterbunden (bzw. vernachlässigt) werden können.

**Schwächen:**

Die große Stärke der Methode ist gleichzeitig auch ihre Schwäche. Da bei den Messungen in gepufferter Lösung sämtliche Parameter erfaßt sind (natürlich mit Ausnahme der zu untersuchenden extrazellulären Konzentrationsänderung), die eine Abnahme der Stromamplitude verursachen, ist zwangsläufig auch die intrazelluläre Konzentrationsänderung mit inbegriffen, die durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verursacht wird. Somit ist eine genaue Quantifizierung des zusätzlichen Einflusses der hervorgerufenen intrazellulären Konzentrationsänderungen auf den Stromverlauf nicht möglich, das Modell erlaubt daher auch keinen direkten Rückschluß auf die Größe der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Inaktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. Zur Lösung dieses Problems bietet sich eine getrennte Messung an, bei der die intrazelluläre Konzentrationsänderung durch einen hochkonzentrierten starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer nahezu vollständig unterbunden wird, wie dies z.B. von Almers et al. (1981) mit einer intrazellulären 80 mM EGTA Lösung durchgeführt wurde. In dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den Experimenten an intakten Fasern auch die von Almers et al. (1981) erzielten Ergebnisse untersucht. Prinzipielle Beschränkungen bei der Kombination dieser beiden Ansätze werden weiter unten im Text diskutiert.

**8. Einfluß der intrazellulären Konzentrationsänderung**

Der Einfluß der intrazellulären Konzentrationsänderung auf den Stromverlauf bei *Voltage-Clamp* Experimenten wurde in der vorliegenden Arbeit für  $\text{K}^+$ -Ionen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen getrennt untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß bei der Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme mit der in dieser Arbeit entwickelten und vorgestellten Methode die zusätzliche Konzentrationsänderung im Sarkoplasma vernachlässigt werden kann. Dies wird im folgenden Abschnitt genauer diskutiert.

**a)  $\text{Ca}^{2+}$** 

Die Rolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Inaktivierung des L-Type Kanals wurde bisher vorwiegend am Herzmuskel untersucht und ist immer noch nicht restlos aufgeklärt.

Die Tatsache, daß die elektromechanische Kopplung im Gegensatz zum Herzmuskel (Fabiato 1983; Beuckelmann und Wier, 1988; Näbauer et al., 1989) im Skelettmuskel nicht vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom durch die TTS-Membran abhängig ist (Caputo, 1968; Armstrong et al., 1972; Miledi et al., 1977) sondern durch spannungsabhängige Protein-Protein Wechselwirkungen des DHP-Rezeptors mit dem Ryanodin-Rezeptor (RyR) ausgelöst wird, (Schneider und Chandler, 1973;

Shirokova et al., 1996) legt die Vermutung nahe, daß die Erkenntnisse des Herzmuskels nicht ohne Weiteres auf den Skelettmuskel übertragen werden können.

Bei der numerischen Untersuchung makroskopischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme wurde in bisher durchgeführten Studien entweder

- (i) die zeitabhängige Kanalkinetik vernachlässigt (Levis et al., 1986),
- (ii) die explizite Spannungsabhängigkeit nicht berücksichtigt (Levis et al., 1986),
- (iii) die extrazellulären Konzentrationsänderungen nicht beachtet (Jafri et al., 1998),
- (iv) Untersuchungen an unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt (Levis et al., 1986; Egelmann und Montague, 1999)
- (v) andere experimentelle Methoden benutzt, die keinen direkten Vergleich von Berechnung und Experiment ermöglichten (Almers et al., 1981; Levis et al., 1986; Egelmann und Montague 1999),
- (vi) oder es lag eine Kombination der oben aufgeführten Punkte vor.

Somit konnte in keiner der vorliegenden Studien eine quantitative Aussage über den jeweiligen Beitrag der intrazellulären und der extrazellulären Konzentrationsänderung vorgestellt werden.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode ist es zum ersten Mal möglich, anhand von experimentell ermittelten Meßdaten eine quantitative Bestimmung des Einflusses von extrazellulären Konzentrationsänderungen auf den Stromverlauf bei *Voltage-Clamp* Experimenten durchzuführen. Die zusätzliche intrazelluläre Konzentrationsänderung wird zur Erklärung des unterschiedlichen Zeitverlaufs der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in extrazellulär gepufferter ( $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$ ) und ungepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung ( $I_{\text{exp}}^{\text{unbuff}}(t)$ ) nicht explizit benötigt. Sie muß und kann vielmehr mit der entwickelten Methode nicht getrennt von der extrazellulären Konzentrationsänderung untersucht werden, da bei der Aufnahme der Ströme  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$  in extrazellulär gepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung die intrazelluläre Konzentrationsänderung bereits in der Messung mit berücksichtigt wird. Es wurde gezeigt, daß eine zusätzliche Berücksichtigung der intrazellulären Konzentrationsänderung nicht zu dem gewünschten Ergebnis führen kann.

Bei der numerischen Berechnung der Ströme  $I_{\text{sim}}^{\text{unbuff}}(t)$  in extrazellulär ungepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung wird die Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sogar weniger stark

ausfallen als dies bei der Messung in gepufferter Lösung der Fall ist, wo aufgrund der geringeren Abnahme der Amplitude insgesamt eine größere Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  in das Faserinnere einströmt.

Untersuchungen mit intrazellulär gepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung wurden 1981 von Almers, Fink und Pallade durchgeführt. Die Autoren untersuchen in ihrer Arbeit den Einfluß der Konzentrationsänderung auf den Stromverlauf mit der „Vaseline-Gap“ Methode (siehe Hille und Campbell, 1976), die es erlaubt sowohl die extrazelluläre als auch die intrazelluläre Lösung zu kontrollieren. Nachteil dieser Vaseline-Gap Methode ist allerdings, daß keine intakten kontrahierenden Fasern untersucht werden können.

Eine vergleichende Simulation mit den von Almers et al. (1981) durchgeführten Messungen mit gepufferter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist im Ergebnisteil gezeigt. Die insgesamt langsamere Kinetik, die beim Einsatz eines intrazellulären Puffers zutage tritt, kann allerdings nicht uneingeschränkt als Argument für einen wesentlichen Einfluß der intrazellulären Konzentrationsänderungen angesehen werden, d. h. es ist nur eine qualitative Aussage über den Einfluß der intrazellulären Pufferung auf den zeitlichen Verlauf des  $\text{Ca}^{2+}$  Stroms im Vergleich zu Messungen ohne zusätzliche intrazelluläre Pufferung (Friedrich et al., 1999) möglich. Eine quantitative Aussage ist aufgrund (i) der unterschiedlichen Faserdimensionen und (ii) der unterschiedlichen Spezies (Almers et al., 1981: Frosch (*M. semitendinosus*; *Rana temporaria*); Friedrich et al., 1999: Maus (*M. interosseus*; BALB/c)) nicht möglich.

Eine vergleichende Messung scheitert an den prinzipiellen experimentellen Beschränkungen der jeweiligen Methoden. Die mit der 2-MVC untersuchten Fasern sollten möglichst kein sein ( $l < 600 \mu\text{m}$ ; Ehmer 1997; Friedrich et al., 1999), diese Voraussetzungen erfüllen die *Mm. interossei* der Maus. Zur Messung von Strömen mit der „Vaseline-Gap“ Methode sollten die Fasern eine Länge von mindestens 2-3 mm besitzen (siehe z.B. Hille und Campbell, 1976; Almers et al. 1981).

Eine weitere Aussage, die einen quantitativen Vergleich von Messungen mit intrazellulär gepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung und Messungen mit intrazellulär ungepufferten  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösungen in Frage stellen könnte, wurde von Francini und Stefani (1989) veröffentlicht. In ihren Experimenten mit nur 20 mM intrazellulärem EGTA fanden die Autoren keinen Hinweis auf eine Strom-„Inaktivierung“ die durch extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen hervorgerufen worden sein könnten. Sie erklären die beobachtete Abnahme der Amplitude der



$\text{Ca}^{2+}$ -Ströme alleine mit Hilfe der spannungsabhängigen Inaktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. In den Messungen von Almers et al. (1981) hingegen wurde das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -mit einer 70 mM EGTA Lösung gepuffert, die Autoren berichten von einer Aufhebung der spannungsabhängigen Inaktivierung und erklären die Abnahme sei „überwiegend“ durch extrazellulären Konzentrationsänderungen im TTS hervorgerufen.

Eine Abschätzung unter alleiniger Berücksichtigung der Abnahme der treibenden Kraft bei einem Membranpotential von 0 mV (siehe MATERIAL UND METHODEN) ergibt insgesamt eine Änderung von 144 mV auf 42 mV, wenn sich sowohl die intrazelluläre Konzentration (wie z.B. von Levis et al. (1986) berichtet) auf 10  $\mu\text{M}$  ändert als auch die extrazelluläre Konzentration von 10 mM auf 0.3 mM abfällt (siehe ERGEBNISSE). Diese insgesamt 70 %-ige Änderung der treibenden Kraft für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird dabei zu 40% von der intrazellulären Konzentrationsänderung hervorgerufen und zu 30% durch die Änderung der extrazellulären Konzentration im TTS. Es sei aber noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, daß eine solche Abschätzung zum Beitrag der intrazellulären Konzentrationsänderung nur qualitativ sein kann da, (i) der quantitative Beitrag der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Inaktivierung, (ii) die genaue intrazelluläre Konzentrationsänderung, (iii) die Rolle der unterschiedlichen Puffer (Calcequestrin, Parvalbumin) und (iv) die intrinsische spannungsabhängige Inaktivierung nicht exakt quantifiziert werden können.

Ein Experiment, das den Einfluß sowohl der intrazellulären als auch der extrazellulären Konzentrationsänderung auf den makroskopischen Stromverlauf quantitativ aufklären könnte wäre eine kombinierte konfokale Untersuchung sowohl der extrazellulären als auch der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit unterschiedlichen Farbstoffen unter *Voltage-Clamp* Bedingungen. Aufgrund der extrem hohen Ansprüche - sowohl an die Orts- als auch an die Zeitauflösung der Bildaufnahme - die eine solche Messung benötigt, müßte ein Setup entwickelt werden, welches beide Bedingungen erfüllt und somit die getrennte Untersuchung der intra- und extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erlaubt. Dabei sollte eine Ortsauflösung von der Hälfte der Größe des TTS-Durchmessers (etwa 50 nm) erreicht werden, die Anforderungen an die Zeitauflösung (bzw. an die Belichtungszeit) sind ebenfalls enorm (kleiner 1  $\mu\text{s}$ ), da aufgrund der Faserkontraktion Bewegungsartefakte auftreten, die bei längerer Belichtung eine Unterscheidung der getrennten Kompartimente verhindern (Zoghbi et al., 2000). Ein Ansatz solch kleine räumliche Ausdehnungen unterhalb des optischen Auflösungsvermögens eines Lichtmikroskops (etwa 200 nm bei blauem Licht) zu erfassen besteht aus einem rechnerischen „*deblurring*“ aus unterschiedlichen Fokalebene (siehe z.B. Uttenweiler und Fink, 1999). Nach heutigem Stand der Technik ist eine solche Untersuchung noch nicht möglich. Ein

möglicher Ansatz wäre die von Zoghbi et al. (2000) entwickelte Methode unter der Verwendung des Farbstoffes X-Rhod 5N zur Detektion der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Kombination mit einem ähnlichen AM-Ester Farbstoff mit unterschiedlichem Anregungs- und Emissionsspektrum zur Detektion von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ , der auch lokale Spitzenkonzentrationen von etwa 0.3 mM nachweisen kann. Somit wäre zumindest prinzipiell eine Momentaufnahme der lokalen Konzentrationsverteilung möglich.

#### b) $\text{K}^+$

Die intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentrationsänderung wurde bei erschöpften Muskelfasern untersucht, bei denen keine Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik vorhanden war. Hierbei wurden keine Messungen in gepufferter Lösung als Eingabe für die Simulation benutzt, somit war eine getrennte Untersuchung des Einflusses der intrazellulären Konzentration auf den Stromverlauf möglich.

Aufgrund der hohen intrazellulären Kaliumkonzentration ( $[\text{K}]_i=140$  mM) führt jedoch eine Änderung der intrazellulären Konzentration auf 130 mM (entspricht einer Änderung von ca. 8%) nur zu einem relativ geringen Effekt. Die extrazelluläre Konzentration steigt dabei im TTS von 2 mM auf 16 mM an, was einer Änderung von 800% entspricht. Dabei ändert sich die treibende Kraft von  $-100$  mV um insgesamt 50.6% auf  $-49.5$  mV, wobei der Anteil der extrazellulären Konzentrationsänderung etwa 49% beträgt und der Anteil der intrazellulären Konzentrationsänderung nur etwa 1.6%.

Eine explizite experimentelle Untersuchung der intrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentrationsänderung wurde nicht durchgeführt. Hier bietet sich ebenfalls eine konfokale Untersuchung mit einem  $\text{K}^+$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff an.

### 9. Messung der extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

In einer vor Kurzem veröffentlichten Publikation wurde von Zoghbi et al. (2000) eine Methode vorgestellt, mit der die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung an kontrahierenden Muskelfasern untersucht werden kann. Bei dieser sogenannten „Schnappschuß-Technik“ („*snapshot imaging technique*“) wurde versucht die intrazellulären Konzentrationsänderungen, die beim Anlegen eines Aktionspotentials entstehen, zu untersuchen. In der Arbeit wurde gefolgert, daß selbst mit diesem neuen (und sehr teuren) Verfahren die prinzipiellen Schwierigkeiten der sub-Sarkomer-Auflösung bei kontrahierenden Fasern selbst bei der

kurzen Belichtungszeit von 7 ns (7 Nanosekunden) nur in Ansätzen beseitigt sind. Die Messung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im TTS stellt aufgrund der geringen Ausdehnung des TTS mit einem Durchmesser eines TTS-Schlauches von ca. 50-100 nm mindestens genau so große Ansprüche an die räumliche Auflösung der Messung.

Zur Untersuchung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mußte ein Fluoreszenzfarbstoff gewählt werden, der einerseits eine hohe Sättigungskonstante besitzt, um die hohen Konzentrationen von bis zu 10 mM freiem  $\text{Ca}^{2+}$  korrekt wiedergeben zu können und andererseits auch mit einer der von unserem ArKr Laser emittierten Wellenlängen (488 nm und 568 nm) angeregt werden kann. Ein Farbstoff der diese Voraussetzungen erfüllt ist X-Rhod-5N von Molecular Probes. In einer anderen Studie benutzten Blatter und Niggli (1998) einen Farbstoff (Calciumgreen C18) um  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen direkt an der Membran des TTS nachzuweisen. Da dieser Farbstoff jedoch in die Phospholipid-Membran eingelagert ist, kann somit nur das  $\text{Ca}^{2+}$  in direkter Membran-Nähe nachgewiesen werden.

Bei der konfokalen Messung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde die Membran der Faser durch die hohe eingestrahlte Laserintensität zerstört, womit die Aufnahme der Eindiffusion des Fluoreszenzfarbstoffs über die komplette Zeitdauer nicht möglich war. Hierbei ist zu bemerken, daß diese Zerstörung zufällig und unregelmäßig auftrat, bei einigen Messungen bereits nach 10 Bildern. Nach Auskunft des Herstellers lag der Fehler in der Steuerungssoftware für die Scan-Einheit unseres konfokalen Mikroskops, wodurch es zu einer unkontrollierten Lasereinstrahlung außerhalb des Beobachtungsfeldes kam.

Anhand der vorgestellten Daten wird deutlich, daß die bestehende Orts- und Zeitauflösung des benutzten konfokalen Systems nicht ausreicht, um bei kontrahierenden Fasern eine experimentelle quantitative Aussage über die zeitliche Entwicklung der Konzentration im TTS treffen zu können.

### **10. Bei einigen Messungen der $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme wurde eine „Zweite Komponente“ gefunden.**

In etwa 40% der untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme trat eine zweite „Reaktivierung“ bzw. ein zweiter Anstieg der Stromamplitude auf (Friedrich et al., 1999). Zur Untersuchung dieses „zweiten Anstiegs“ wurden Versuche mit einer High-Kalium Lösung durchgeführt, um eine mögliche

Überlagerung durch einen Kaliumausstrom im angesprochenen Zeitraum von 200 msec bis 500 msec zu untersuchen und um somit den vermeintlichen Anstieg als Artefakt zu entlarven.

Dazu gelang bei einer Faser mit dem zweiten Anstieg der Amplitude in ungepuffelter Lösung der Lösungswechsel auf die High-Kalium Lösung, bei der die extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration auf Werte von 140 mM (KBr) in ungepuffelter Lösung und 154 mM (KBr) in gepuffelter Lösung erhöht wurde, um die extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration auf den Wert der intrazellulären  $K^+$ -Konzentration anzugleichen und somit das Nernst-Potential für Kalium auf einen Wert von  $E_K=0$  mV zu erhöhen. Interessanterweise fehlte hier tatsächlich der zweite Anstieg bei einem Kommandopotential von  $V_{\text{clamp}}=0$  mV. Aufgrund der experimentell äußerst schwierigen Bedingungen (siehe weiter unten) konnte keine weitere Messung durchgeführt werden, daher kann keine definitive Aussage über den Ursprung der „zweiten Komponente“ getroffen werden. Durch die hohe Kaliumkonzentration und die drei benötigten Lösungswechsel (1. ungepufferte  $Ca^{2+}$ -Lösung, 2. Wechsel auf extrazellulär gepufferte  $Ca^{2+}$ -Lösung zur Untersuchung, ob eine „zweite Komponente“ vorhanden war, mit anschließendem 3. Wechsel auf ungepufferte High- $K^+$ - $Ca^{2+}$ -Lösung und 4. Wechsel auf extrazellulär gepufferte High- $K^+$ - $Ca^{2+}$ -Lösung) war die Überlebensrate der Einzelfasern sehr gering. Eine weitergehende detaillierte Untersuchung dieses interessanten Phänomens würde allerdings keine neue Erkenntnis über den Einfluß der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderungen auf den  $Ca^{2+}$ -Stromverlauf bringen und daher den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

## **11. Vergleich des Einflusses von Konzentrationsänderungen im TTS des Skelettmuskels mit dem Einfluß des Effekts bei anderen Zelltypen**

Bei den numerischen Untersuchungen der  $Ca^{2+}$ -Ströme am Skelettmuskel wurde in einigen Fällen ein Abfall der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Fasermitte auf etwa 7% der initialen Konzentration beobachtet, in einem Fall einer dickeren Faser wurde sogar eine Konzentration von nur 3% des initialen Wertes berechnet. Konzentrationsänderungen dieser Größenordnung treten auch in anderen Zelltypen auf, die Kompartimente mit verringertem Diffusionszugang zur Badlösung besitzen.

Zwei Beispiele, in denen ebenfalls eine massive Konzentrationsänderung mit Einfluß auf den Stromverlauf beschrieben wurden sind:

- (i) Purkinjefasern, von Levis et al. (1983) untersucht. Die Autoren stellten fest, daß die von ihnen berechnete intrazelluläre und extrazelluläre Konzentrationsänderung aus-

reicht um die fast vollständige „Inaktivierung“ des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms vollständig zu erklären. Allerdings wurden in deren Arbeit die intrinsischen Kanaleigenschaften wie Inaktivierung und Spannungsabhängigkeit nicht berücksichtigt.

- (ii) Neuronales Gewebe des Säugers, von Egelmann und Montague (1999) untersucht. Die Autoren berechneten die  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen die während normaler neuronaler Aktivität im Gehirn auftreten und kommen zu dem Schluß, daß in den kleinen extrazellulären Zwischenräumen zwischen den Synapsen und Gliazellen eine bis zu 100%ige Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration stattfindet. Sie schließen, daß sich das Gehirn im Verlauf der Evolution soweit angepaßt hat, daß diese Konzentrationsänderungen ein wichtiger Bestandteil der normalen Informationsverarbeitung werden konnten.

## 12. Zusammenfassung & Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode vorgestellt, die es zum ersten Mal ermöglicht, den Einfluß von extrazellulären Konzentrationsänderungen auf den Stromverlauf bei *Voltage-Clamp* Experimenten quantitativ zu untersuchen. Als Modellsystem wurde der Skelettmuskel gewählt. Es wurde hierbei prinzipiell zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen und  $\text{K}^+$ -Strömen unterschieden.

Bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen kommt es zu einer Abnahme der Konzentration im transversen tubulären System (TTS), die einerseits die treibende Kraft gemäß der Nernst-Gleichung beeinflusst, und andererseits gleichzeitig zu einer Abnahme der Ladungsträger führt, die den Strom hervorrufen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme fließen fast ausschließlich durch die TTS-Membran. Bei  $\text{K}^+$ -Strömen hat die Konzentrationsänderung im TTS nur einen Einfluß auf die treibende Kraft. Die Konzentration der Ladungsträger im Faserinneren ändert sich nur unwesentlich. Die  $\text{K}^+$ -Ströme fließen zu unterschiedlichen Anteilen durch die TTS-Membran und die "scheinbare" Oberflächenmembran (ASM).

Bei dieser Methode werden experimentell aufgenommene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in gepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung  $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}$  als Eingabedaten für eine Simulation benutzt, die den zeitlichen Verlauf des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms berechnet, wie er ohne extrazellulären Puffer gemessen worden wäre. Diese Berechnungen  $I_{\text{sim}}^{\text{unbuff}}$  werden direkt mit experimentellen Messungen  $I_{\text{exp}}^{\text{unbuff}}$  der selben Muskelfaser in ungepufferter Lösung verglichen.

Die in der Arbeit vorgestellten numerischen Ergebnisse bestätigen die „Depletion-Hypothese“, d. h. die Hypothese, daß extrazelluläre Konzentrationsänderungen im transversen tubulären System des Skelettmuskels den zeitlichen Verlauf signifikant beeinflussen. In einigen Präparaten findet eine Abnahme der tubulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf nur 3% des initialen Werts statt.

Die Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die bereits unter vereinfachten Simulationen an Herzmuskeln veröffentlicht wurden (siehe auch vorheriger Abschnitt). Interessanterweise wird zur Beschreibung der zeitlichen Entwicklung

der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme keine zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Inaktivierung benötigt (wie von Neely et al. (1994) für die in *Xenopus* Oozyten exprimierten  $\alpha 1$ -Untereinheit des Herz-DHP Kanals beschrieben), um eine sehr gute Übereinstimmung der simulierten Daten mit den experimentellen Daten zu erreichen.

Als Anwendungsbeispiel wurde der Kaliumstrom von erschöpften Muskelfasern (*M. Sartorius*, *Rana temporaria*) untersucht. Hier standen keine Eingabedaten aus gepufferter Lösung zur Verfügung. Die berechneten Ströme und der Einfluß der Konzentrationsänderung wurde mit Messungen verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß die Kanaldichte des ATP-abhängigen Kaliumkanals ( $K_{\text{ATP}}$ ) im TTS nur  $20\% < \vartheta < 40\%$  der Kanaldichte der Oberflächenmembran betragen kann. Ein direkter Vergleich mit Literaturwerten ist für den  $K_{\text{ATP}}$  nicht möglich, aber anhand von Kanaldichten für den *Delayed-Rectifier* liegt der ermittelte Wert im gleichen Bereich. Bei der Analyse wurde ein Flächenverhältnis von TTS zu Gesamtmembran von  $f_T=66\%$  angenommen.

### Ausblick

In einer weitergehenden Studie könnten (i) der Ansatz von Blatter und Niggli (1998) zur Untersuchung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, (ii) die Methode von Zoghbi et al. (2000) zur Untersuchung der intrazellulären Konzentrationsänderung mit (iii) den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen und Simulationen in gepufferter und ungepufferter  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung kombiniert werden. Durch diese Erweiterung wäre es möglich, die Änderung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -und des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -direkt zu quantifizieren und den Zusammenhang zwischen spannungsabhängiger Inaktivierung und Konzentrationsänderungen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

Sehr interessant wäre auch eine Anwendung des Modells an anderen Fragestellungen, z.B. bei der Untersuchung von Transportprozessen. Durch eine geeignete Anpassung der zugrundeliegenden Geometrie ist es prinzipiell möglich, sehr vielfältige Fragestellungen zu untersuchen, bei denen ein Strom- oder auch ein Materiefluß entweder (i) aus vereinfachten Modellvorhersagen gewonnen wurde oder (ii) *in vitro* unter begünstigenden Bedingungen gemessen wurden (d.h. bei denen künstlich für ausreichende Zu- und Abfuhr des untersuchten Substrates gesorgt wird), und das Verhalten des untersuchten Systems *in vivo* vorhergesagt werden soll, wenn eine Verknappung der Ressourcen aufgrund von sich erschöpfenden Speichern oder mangelndem Abfluß zu erwarten ist.





## VI. Literaturverzeichnis

1. Abramowitz, M. and I.A. Stegun. (1964). *Handbook of Mathematical Functions*. National Bureau of Standards. Washington.
2. Adrian, E.D. (1914). The all-or-none principle in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* 47, 460-474.
3. Adrian, R. H. (1983). Electrical Properties of striated muscle. In: *Handbook of Physiology*, Section 10, Skeletal Muscle, Chapter 2, Peachey, L.D., Adrian, R.H. and Geiger, S.R., eds., American Physiological Society, Bethesda, MD, pp. 275-300.
4. Adrian, R. H., W. K. Chandler and A. L. Hodgkin. (1969a). The kinetics of mechanical activation in frog muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 204, 207-230.
5. Adrian, R. H., W. K. Chandler and A. L. Hodgkin. (1969b). Radial spread of contraction in frog muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 204, 231-257.
6. Adrian, R. H., W. K. Chandler and A. L. Hodgkin. (1970). *Voltage-Clamp* experiments in striated muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 208, 607.
7. Adrian, R. H. and L. D. Peachey. (1973). Reconstruction of the action potential of frog sartorius muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 235, 103-131.
8. Allen, D.G., H. Westerblad, J.A. Lee and J. Lännergren. (1992). Role of excitation contraction coupling in muscle fatigue. *Sports Med.* 13, 116-126.
9. Almers, W. (1972a). Potassium conductance changes in skeletal muscle and the potassium concentration in the transverse tubules. *J. Physiol. (Lond.)* 225, 33-56.
10. Almers, W. (1972b). The decline of potassium permeability during extreme hyperpolarisation in frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 225, 57-83.
11. Almers W., R. Fink and P. T. Palade. (1981). Calcium Depletion in Frog Muscle Tubules, The Decline of Calcium Current under Maintained Depolarisation. *J. Physiol. (Lond.)* 312, 177-207.
12. Almers, W. and P. T. Palade. (1981). Slow Calcium and potassium currents across frog muscle Membrane, Measurements with a *Vaseline-Gap* technique. *J. Physiol. (Lond.)* 312, 159-176.
13. Amasheh, S. and W.M. Weber. (1999). Further characteristics of the  $\text{Ca}^{2+}$  inactivated  $\text{Cl}^-$  channel in *xenopus laevis* Oocytes. *J. Membrane Biol.* 172, 169-179.
14. Amsellem, J., R. Delorme, C. Souchier and C. Ojeda. (1995). Transverse-axial tubular system in guinea pig ventricular cardiomyocyte, 3D reconstruction, quantification and its possible role in  $\text{K}^+$  accumulation-depletion phenomenon in single cells. *Biologie Cellulaire* 85, 43-54.
15. Andersson-Cedergren, E. (1959). Ultrastructure of motor end-plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fibre as revealed by three dimensional reconstruction from serial sections. *J. Ultrastruct. Res. 1 Suppl.* 5, 1-191.
16. Armstrong, C. M. and R. H. Chow. 1987. Supercharging, a method for improving patch-clamp performance. *Biophys. J.* 52, 133-136.
17. Armstrong, C.F., F. Bezanilla and P. Horowitz. (1972). Twitches in the presence of ethylen glycol-bis(beta-aminoethyleter)-N, N'-tetraacetic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 267, 605-608.
18. Arrhenius, S. (1887). Über die Dissociation der in Wasser gelösten Stoffe. *Zeit. physik. chem.* 1, 631-648.
19. Ashcroft S. J. and F. M. Ashcroft (1990). Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.* 2(3), 197-214.
20. Ashcroft, F. M., J. A. Heiny and J. Vergara. (1985). Inward rectification in the transverse tubular system of frog skeletal muscle studied with potentiometric dyes. *J. Physiol. (Lond.)* 359, 269-291.
21. Attwell, D., D. Eisner and I. Cohen (1979). *Voltage-Clamp* and tracer flux data, effects of a restricted extracellular space. *Quarterly Rev. of Biophys.* 12(3), 213-261.
22. Band, D.M. and R.A.F. Linton. (1986). The effect of potassium on carotid body chemoreceptor discharge in the anaesthetized cat. *J. Physiol. (Lond.)* 381, 39-47.
23. Band, D.M., R.A.F. Linton, R. Kent and F.L. Kuerr. (1985). The effect of peripheral chemodeneration on the ventilatory response to potassium. *Respir. Physiol.* 60, 217-225.
24. Barry, P. H. 1998. Derivation of Unstirred-Layer Transport Number Equations from the Nernst-Planck Flux Equations *Biophys. J.* 74, 2903-2905.
25. Barry, P. H. and R. H. Adrian. (1973). Slow conductance changes due to potassium depletion in the transverse tubular system of frog muscle fibers during hyperpolarizing pulses. *J. Membr. Biol.* 14, 243-291.
26. Barry, P.H. and J.M. Diamond. (1984). Effects of unstirred layers on membrane phenomena. *Physiol. Rev.* 64(3), 763-872.
27. Barry, P.H. and A.F. Dulhunty. (1983). Slow conductance changes in mammalian muscle fibers during prolonged hyperpolarization. *Proc. Aust. Physiol. Pharmacol. Soc.* 14, 41P.
28. Barry, P.H. and A.F. Dulhunty. (1984). Slow potential changes in mammalian muscle fibers during prolonged hyperpolarization: transport number effects and chloride depletion. *J. Membrane Biol.* 78, 235-248.
29. Barry, P. H. and A. B. Hope. (1969). Electro osmosis in membranes, effects of unstirred layers and transport numbers, I. Theory. *Biophys. J.* 9, 700-728.
30. Baumann, O., T. Kitazawa and A.P. Somlyo. (1990). Laser confocal Scanning Microscopy of the surface membrane/T-Tubular system and the sarcoplasmic reticulum in insect striated muscle stained with DiIC<sub>18</sub>(3). *J. Struct. Biol.* 105, 154-161.
31. Baumgarten C.M. and G. Isenberg (1977). Depletion and accumulation of potassium in the extra-cellular spaces of cardiac Purkinje fibres during *Voltage-Clamp*

- hyperpolarisation and depolarisation. *Pflügers Arch.* 368, 19-31.
32. Baylor, S.M., W.K. Chandler and M.W. Marshall. (1983). Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibres estimated from arsenazo III calcium transients. *J. Physiol. (Lond.)* 334, 625-666.
33. Baylor, S.M. and S. Hollingworth. (1998). The transient binding of calcium to ATP and diffusion of Ca-ATP help shape the amplitude and time course of the myoplasmic free Ca transient. *Biophys. J.* 74, A235. (abstr.)
34. Beatty, G.N. and E. Stefani. 1976. Inward calcium current in twitch muscle fibers of the frog. *J. Physiol. (Lond.)* 260, 27p. (abstr.)
35. Bennet, H.S. and K.R. Porter. (1953). An electron microscopic study of sectioned breast muscles of domestic fowl. *Am. J. Anat.* 93, 61-105.
36. Beuckelmann, M.B. and W.G. Wier. (1988). Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J. Physiol. (Lond.)* 405, 233-255.
37. Blatter, L. A and E. Niggli. (1998). Confocal near membrane detection of calcium in cardiac myocytes. *Cell Calcium.* 23(5), 269-279.
38. Brazier, M.A.B. (1959). The historical development of neurophysiology. In Field J. (Ed.) *Handbook of Physiology. Section 1: Neurophysiology.* Washington, Am. J. Physiol. Soc. Vol 1, p1-59.
39. Brown, H.F., A. Clark and S.J. Noble (1976a). Identification of the pacemaker current in frog atrium. *J. Physiol. (Lond.)* 258, 521-545.
40. Brown, H.F., A. Clark and S.J. Noble (1976b). Analysis of pacemaker and repolarisation currents in frog atrial muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 258, 547-577.
41. Buchtal, F. and H. Schmalbruch. (1980). Motor unit of mammalian muscle. *Physiol. Rev.* 60, 90-142.
42. Burger, R.E., J.A. Estavillo, P. Kumar, P.C.G. Nye and D.J. Paterson. (1988). Effects of potassium, oxygen and carbon dioxide on the steady-state discharge of cat carotid body chemoreceptors. *J. Physiol. (Lond.)* 401, 519-531.
43. Campbell, D. T. (1976). Ionic selectivity of the sodium channel in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 67, 295-307.
44. Cannell, M. B. and D. G. Allen. 1984. Model of calcium movement during activation in the sarcomere of frog skeletal muscle. *Biophys. J.* 45, 913-925.
45. Cannell, M.B., J. R. Berlin and W. J. Lederer. (1987). Effect of membrane potential changes on the calcium transient in single rat cardiac cells. *Science* 238, 1419-1423.
46. Cannon S.C., R. H. Brown Jr, and D. P. Corey. (1993). Theoretical reconstruction of myotonia and paralysis caused by incomplete inactivation of sodium channels. *Biophys. J.* 65(1), 270-288.
47. Caputo, C. (1968). The role of calcium in the process of excitation and contraction in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 51 (Suppl. 5), 180S
48. Castle, N.A. and D.G. Haylett. (1987). Effect of channel blockers on potassium efflux from metabolically exhausted frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 383, 31-45.
49. Cleeman, L. and Morad, M. (1976). Extracellular potassium accumulation and inward going rectification in *Voltage-Clamped* ventricle muscle. *Science* 191, 90-92.
50. Cleeman, L. and Morad, M. (1979a). Extracellular potassium accumulation in *Voltage-Clamped* frog ventricular muscle *J. Physiol. (Lond.)* 286, 83-112.
51. Cleeman, L. and Morad, M. (1979b). Potassium currents in frog ventricular muscle, evidence from *Voltage-Clamp* currents and extracellular  $K^+$  accumulation *J. Physiol. (Lond.)* 286, 113-140.
52. Cleeman, L. and Morad, M. (1991). Role of  $Ca^{2+}$  channel in cardiac excitation-contraction coupling in the rat, evidence from  $Ca^{2+}$  transients and contraction. *J. Physiol. (Lond.)* 432, 283-312.
53. Cohen, I. and R. Kline. (1982).  $K^+$  fluctuations in the extracellular spaces of cardiac muscle. *Circ. Res.* 50(1), 1-16.
54. Cole, K.S. (1972). *Membranes, Ions and Impulses.* University of California Press.
55. Collier, M.L., A.P. Thomas and J.R. Berlin. (1999). Relationship between L-Type  $Ca^{2+}$  current and unitary sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release events in rat ventricular myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 516.1, 117-128.
56. Cota, G. and E. Stefani. (1989) Voltage-dependent inactivation of slow calcium channels in intact twitch muscle fibers of the frog. *J. Gen. Physiol.* 94(5), 937-51.
57. Cota, G., L. Nicola-Siri, and E. Stefani. 1983. Calcium-channel gating in frog skeletal muscle membrane, effects of temperature. *J. Physiol. (Lond.)* 338, 395-412.
58. Cota, G., L. Nicola-Siri, and E. Stefani. 1984. Calcium channel inactivation in frog (*Rana pipiens* and *Rana montezuma*) skeletal muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 354, 99-108.
59. Crank, J. 1975. *The Mathematics of Diffusion.* Oxford University Press.
60. Davies, N.W. (1990). Modulation of ATP-sensitive  $K^+$  channels in skeletal muscle by intracellular protons. *Nature* 343, 375-377.
61. Davis, P.J. (1994). *Erfahrung Mathematik.* Birkhäuser. Basel, Schweiz.
62. Delbono O. and E. Stefani (1993a). Calcium current inactivation in denervated rat skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 460, 173-183.
63. Delbono, O. and E. Stefani. (1993b). Calcium transients in single mammalian skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 463, 698-707.
64. Dietze, B., F. Bertocchini, V. Barone, A. Struck, V. Sorrentino and W. Meltzer. (1998). Voltage-controlled  $Ca^{2+}$  release in normal and ryanodine receptor type 3 (RyR3)-deficient mouse myotubes. *J. Physiol. (Lond.)* 513.1, 3-9.
65. DiFrancesco, D., and D. Noble. (1985). A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 307, 353-398.
66. Donaldson, P.L. and K.G. Beam. (1983). Calcium currents in a fast-twitch skeletal muscle of the rat. *J. Gen. Physiol.* 82, 449-468.

67. Dulhunty A.F. and M. Dultowski. (1979). Fiber types in red and white segments of rat sternomastoic muscle. *Am. J. Anat.* 156, 51-61.
68. Dulhunty, A. (1982). Effect of chloride withdrawal on the geometry of the T-tubules in amphibian and mammalian muscle. *J. Membr. Biol.* 67, 81-90.
69. Dulhunty, A. F. and C. Franzini-Armstrong. (1975). The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. *J. Physiol. (Lond.)* 250, 513-558.
70. Dulhunty, A., G. Carter and C. Hinrichsen. (1984). The membrane capacity of mammalian skeletal muscle fibers. *J. Musc. Res. Cell Motility* 5, 315-332.
71. Egelman, D. M. and P. R. Montague. (1999) Calcium dynamics in the extracellular space of mammalian neural tissue. *Biophys. J.* 76(4), 1856-1867.
72. Ehmer, T. (1997). *Untersuchung des Einflusses lokaler Ionenkonzentrationsänderungen im transversen tubulären System (TTS) des Skelettmuskels auf den Stromverlauf bei Voltage-Clamp Experimenten.* Heidelberg, 1997. Fakultät für Physik und Astronomie. Diplomarbeit.
73. Ehmer, T., O. Friedrich, D. Uttenweiler, P.H. Barry and R.H.A. Fink. (2000). Numerical Analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  depletion in the transverse tubular system (TTS) of mammalian muscle fibers. *Biophys. J.* in press.
74. Eisenberg R.S., R. T. Mathias and J. S. Rae (1977). Measurement, modeling, and analysis of the linear electrical properties of cells. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 303, 342-354.
75. Eisenberg, B.R. and A.M. Kuda. (1975). Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. II. White vastus muscle of the adult guinea pig. *J. Ultrastruct. Res.* 51, 176-187.
76. Eisenberg, B.R. and A.M. Kuda. (1976). Discrimination between fiber populations in mammalian skeletal muscle by using ultrastructural parameters. *J. Ultrastruct. Res.* 54, 76-88.
77. Eisenberg, B.R. and L.D. Peachey. 1975. The network parameters of the T-System in frog muscle measured with the high voltage electron microscope. *Annu. Proc. Electron Microsc. Soc. Am.*, 33<sup>rd</sup>, Las Vegas, Nevada, 1975. p. 550-551.
78. Eisenberg, B.R., A.M. Kuda and J.B. Peter. (1974). Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. I. Soleus muscle of the adult guinea pig. *J. Cell Biol.* 60, 732-754. (1975). Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. II. White vastus muscle of the adult guinea pig. *J. Ultrastruct. Res.* 51, 176-187.
79. Eisenberg, R. S. 1983. Impedance measurement of the electrical structure of skeletal muscle. In: *Handbook of Physiology, Section 10, Skeletal Muscle, Chapter 2*, Peachey, L.D., Adrian, R.H. and Geiger, S.R., eds., American Physiological Society, Bethesda, MD, pp. 301-324.
80. Eisenberg, R. S. and P. W. Gage. (1969). Ionic conductances of the surface and transverse tubular membranes of Frog Sartorius Fibers. *J. Gen. Physiol.* 53, 279-297.
81. Emsley, J. (1989) *The Elements.* Clarendon Press, London.
82. Fabiato, A. (1985). Simulated calcium current can both cause calcium loading and trigger the calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned Purkinje cell. *J. Gen. Physiol.* 85, 291-320.
83. Fahrenbach, W.H. (1967). The fine structure of fast and slow crustacean muscle. *J. Cell. Biol.* 22, 67-79.
84. Falk, G. 1968. Predicted delays in the activation of the contractile system. *Biophys. J.* 8, 608-625.
85. Falk, G. and P. Fatt. (1964). Linear electrical properties of striated muscle fibres observed with intracellular electrodes *Proc. R. Soc. London Ser. B* 160, 69-123.
86. Fambrough, D. M., B. A. Wolitzky, M. M. Tamkin and K. Takeyasu. (1987). Regulation of the sodium pump in excitable cells. *Kidney Int* 32 (suppl. 23), S97-S112.
87. Faraday, M. (1834). Experimental researches on electricity. Seventh Series. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 124, 77-122.
88. Fatt, P. and B. Katz. (1953). The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 120, 171-204.
89. Fawcett, D.W. and J.P. Revel. (1961). The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1(4), Suppl., 89-109.
90. Feierabend, M. (1999). *Aufbau und Kalibrierung eines konfokalen Meßsystems mit UV-Lasereinkopplung zur Herstellung von Myofibrillenpräparaten mittels Mikrowegablation.* Heidelberg, 1999. Fakultät für Physik und Astronomie. Diplomarbeit.
91. Feldmeyer, D., W. Melzer, B. Pohl, P. Zöllner. 1993. A possible role of sarcoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  release in modulating the slow  $\text{Ca}^{2+}$  current of skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 425, 54-61.
92. Fenn, W.O. (1938). *Am. J. Physiol.* 124, 213-227.
93. Fink, R. (1975). A large increase in potassium conductance of poisoned & exhausted skeletal muscle fibres. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 359, R71.
94. Fink, R., K. Grocki and H.Ch. Lüttgau. (1980a). The effect of energy deprivation and hypersomolarity upon tubular structures and electrophysiological parameters of muscle fibres. *Eur. J. Cell Biol.* 21, 101-108.
95. Fink, R., K. Grocki and H.Ch. Lüttgau. (1980b). Na/K selectivity, ion conductances and net fluxes of  $\text{K}^{+}$  and  $\text{Na}^{+}$  in metabolically exhausted muscle fibres. *Eur. J. Cell Biol.* 21, 109-115.
96. Fink, R., S. Hase, H.Ch. Lüttgau and E. Wettwer. (1983). The effect of cellular energy reserves and internal calcium ions on the potassium conductance in skeletal muscle of the frog. *J. Physiol. (Lond.)* 336, 211-228.
97. Fink, R. and H.Ch. Lüttgau. (1973). The effect of metabolic poisons upon the membrane resistance of striated muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 234, 29P-30P.
98. Fink, R. and H.Ch. Lüttgau. (1976). An evaluation of the membrane constants and the potassium conductance in metabolically exhausted fibres. *J. Physiol.* 263, 215-238.
99. Fink, R. and E. Wettwer (1978). Modified K-channel gating by exhaustion and the block by internally applied TEA<sup>+</sup> and 4-aminopyridine in muscle. *Pflügers Arch.* 374, 289-292.
100. Finkel, A. S. and P. W. Gage. (1985). Conventional Voltage-Clamping with two intracellular microelectrodes. In *voltage and Patch Clamping with Microelectrodes*, ed. Smith, T. Jr Williams & Wilkins, Baltimore.

101. Fitts, R. H. (1994). Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol. Rev.* 74, 49-94.
102. Francini, F. and E. Stefani. (1989). Decay of the slow calcium current in twitch muscle fibers of the frog is influenced by intracellular EGTA. *J. Gen. Physiol.* 94, 953-969.
103. Francini, F., L. Pizza and G. Traina. (1992). Inactivation of the slow calcium currents in twitch skeletal muscle fibers of the frog. *J. Physiol. (Lond.)* 448, 633-653.
104. Franzini-Armstrong, C. (1980). Structure of the sarcoplasmic reticulum. *Federation Proc.* 39, 2403-2409.
105. Franzini-Armstrong, C. and L.D. Peachey. (1981). Striated muscle – contractile and control mechanisms. *J. Cell Biol.* 91, 166s-186s.
106. Freygang, W.H.Jr, D.A. Goldstein, D. C. Hellam and L.D. Peachey (1964). The relation between the late after potential and size of the transverse tubular system of frog muscle. *J. Gen. Physiol.* 48, 235-263.
107. Freygang, W.H.Jr, S.I. Rapport and L. D. Peachey. (1967). Some relations between changes in the linear electrical properties of striated muscle fibres and changes in ultrastructure. *J. Gen. Physiol.* 50, 2437-2458.
108. Friedrich, O., T. Ehmer and R. H. A. Fink. (1999). Calcium currents during contraction and shortening in enzymatically isolated murine skeletal muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 517.3, 757-770.
109. Fujimaki, N., L.D. Peachey, T. Muramaki and H. Ishikawa. (1993). Three dimensional visualization of the T-System in fixed and embedded frog skeletal muscle fibers by confocal laser scanning reflection microscopy. *Bioimages* 1, 176-174.
110. Fulton, J.F. and H. Cushing. (1936). A bibliographical Study of the Galvani and the Aldini writings on animal electricity. *Ann-Sci.* 1, 239.
111. Gage, P. and R. S. Eisenberg. (1969). Capacitance of the surface and transverse tubular membrane of frog sartorius muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 53, 265-278.
112. García, J. and M. F. Schneider. (1993). Calcium transients and calcium release in rat fast twitch skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 454, 183-196.
113. García, J., K. McKinley, S. H. Appel and E. Stefani. (1992).  $\text{Ca}^{2+}$  current and charge movement in adult single human skeletal muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 454, 183-196.
114. Gera, S. and L. Byerly. (1999). Measurement of Calcium Channel inactivation is dependent upon the test pulse potential. *Biophys. J.* 76, 3076-3088.
115. Gissel, H. and T. Clausen. (1999). Excitation induced  $\text{Ca}$  uptake in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. (Lond.)* 276 (regulatory Integrative Comp. Physiol. 45), R331-R339.
116. Heiny, J.A., F.M. Ashcroft and J. Vergara. (1983). T-System optical signals associated with inward rectification in skeletal muscle. *Nature* 301, 164-166.
117. Hermann, L. (1877). Untersuchungen über die Entwicklung des Muskelstroms. *Arch. ges. Physiol.* 15, 191-242.
118. Hermann, L. (1905). Beiträge zur Physiologie und Physik des Nerven. *Arch. ges. Physiol.* 109, 95-144.
119. Hill, A.V. (1965). *Trails and Trials in Physiology*. London, Arnold.
120. Hille, B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes. 2<sup>nd</sup> Edition*. Sinauer Associates. Sunderland, MA.
121. Hille, B. and D.T. Campbell. (1976). The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 148, 127-160.
122. Hille, B., A. M. Woodhull and B. I. Shapiro. 1975. Negative surface charge near sodium channels of nerve, Divalent ions, monovalent ions and pH. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 270, 301-318.
123. Hinrichsen, C. and A. Dulhunty. (1982). The contractile properties, histochemistry, ultrastructure and electrophysiology of the cricothyroid and posterior cricoarytenoid muscles in the rat. *J. Muscle Research and Cell Motility* 3, 169-190.
124. Hodgkin, A.L. and P. Horowicz. (1960). The effect of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 153, 370-385.
125. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley. (1939). Action potentials in single nerve fibre. *Nature* 144, 710-711.
126. Huang, C.L.-H. and L.D. Peachey. (1989). the anatomical distribution of voltage dependent membrane capacitance in frog skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 93, 565-584.
127. Huang, C.L.-H. and L.D. Peachey. (1992). A reconstruction of charge movements during the action potential in frog skeletal muscle. *Biophys. J.* 61, 1133-1146.
128. Huxley, A.F. (1977). Looking back on muscle. In: *The Pursuit of Nature, Informal Essays on the History of Physiology*. Cambridge Univ. Press, p.23-64.
129. Jack, J. J. B., D. Noble and R.W. Tsien. (1975). *Electric Current Flow in Excitable Cells*. Oxford, Clarendon Press.
130. Jacquemond, V. (1997). Indo-1 fluorescent signals elicited by membrane depolarisation in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 73, 920-928.
131. Jafri, M. S., J.J. Rice and R.L. Winslow. (1998). Cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  Dynamics, The Roles of Ryanodine Receptor Adaptation and Sarcoplasmic Reticulum Load. *Biophys. J.* 74, 1149-1169.
132. Kim, A.M. and J.L. Vergara. (1998a) Supercharging accelerates T-tubule membrane potential changes in Voltage-Clamped frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 75, 2098-2116.
133. Kim, A.M. and J.L. Vergara. (1998b). Fast voltage gating of  $\text{Ca}^{2+}$  release in frog skeletal muscle revealed by supercharging pulses. *J. Physiol. (Lond.)* 511.2, 509-518.
134. Kirsch, W. (1997). *Aufbau und Testen einer verbesserten „Vaseline-Gap“-Apparatur für Voltage-Clamp Messungen mit simultaner Fluoreszenzspektroskopie*. Heidelberg, Fakultät für Physik und Astronomie. Diplomarbeit.
135. Kirsch, G. E., R. A. Nichols and S. Nakajima. (1977). Delayed rectification in the transverse tubules. *J. Gen. Physiol.* 70, 1-21.
136. Kohlrausch, F. (1876). Ueber das Leitungsvermögen der in Wasser gelösten Elektrolyte im Zusammenhang mit der Wanderung ihrer Bestandtheile. *Nachr. K. Ges. der Wiss. (Göttingen)*. 1876, 213-244.

137. Kössler, F., G. Caffier and F. Lange. (1990). Probleme der Muskelermüdung - Beziehung zur Erregungsleitungsgeschwindigkeit und  $K^+$ -Konzentration. *Z. Gesamte Hyg.* 36, 354-356.
138. Krstic, R.V. (1976). *Ultrastruktur der Säugerzelle*. Heidelberg, Springer.
139. Lakshminarayanaiah, N. (1984). *Equations of membrane Biophysics*. Orlando, Academic Press.
140. Lamb, G.D. (1986). Asymmetric charge movement in contracting skeletal muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 376, 63-83.
141. Landau, L.D. and E.M. Lifschitz. (1991). *Lehrbuch der Theoretischen Physik, Band 5&9: Statistische Physik I&II*. 3. Überarbeitete Auflage. Berlin. Akademie-Verlag.
142. Leeuwenhoek, A. van. (1712). A letter from Mr. Anthony van Leeuwenhoek, F.R.S. Containing his observations upon the seminal vesicles, muscular fibres, and blood of whales. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 27, 438-446.
143. Levis, R. A., R. T. Mathias and R. S. Eisenberg. (1983). Electrical properties of sheep purkinje strands. Electrical and chemical potentials in the clefts. *Biophys. J.* 44(2), 225-248.
144. López-López, J.R., P.S. Shacklock, C.W. Blake and W.G. Wier. (1995). Local calcium transients triggered by single L-Type calcium channel currents in cardiac cells. *Science* 268, 1042-1054.
145. Lorkovic, H. and R. Rüdel. (1983). Influence of divalent cations on potassium contracture duration in frog muscle fibers. *Pflügers Arch.* 398, 114-119.
146. Lucas, K. (1909). The 'all or none' contraction of amphibian skeletal muscle fibre. *J. Physiol. (Lond.)* 38, 113-133.
147. Luff A.R. and H.L. Atwood. (1971). Changes in the sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system of fast and slow skeletal muscles of the mouse during postnatal development. *J. Cell. Biol.* 51, 369-383.
148. Luo, C.H. and Y. Rudy. (1994). A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ. Res.* 1071-1096.
149. Makabe, M, O. Werner and R.H.A. Fink. (1996). The contribution of the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -transport-ATPase to caffeine induced  $Ca^{2+}$ -transients of murine skeletal muscle fibres. *Pflügers Arch.* 432, 717-726.
150. Martell, A. E. and R.M. Smith. (1977) Critical Stability Constants, Vol. 6, *Plenum Press, New York*
151. Mathias R. T., R. S. Eisenberg and R. Valdiosera. (1977) Electrical properties of frog skeletal muscle fibers interpreted with a mesh model of the tubular system. *Biophys. J.* 17, 57-93.
152. Mathias, R.T., R.A. Levis and R.S. Eisenberg. (1980). Electrical models of excitation-contraction coupling and charge movement in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 76, 1-31.
153. Maughan, D.N. (1973). Some effects of prolonged depolarisation on membrane currents in bullfrog atrial muscle. *J. Membr. Biol.* 11, 331-352.
154. McDonald, T.F., A. Cavalie, W. Trautwein and D. Pelzer. (1986). Voltage dependent properties if macroscopic and elementary calcium channel currents in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 406, 437-448.
155. McKenna, M.J. (1992). The role of ionic processes in muscular fatigue during exercise. *Sports Med.* 13, 134-145.
156. McKillen, H. C., N.W. Davies, P. R. Stanfield and N. B. Standen. (1994). The effect of intracellular anions on ATP-dependent potassium channels of rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 479, 341-351.
157. Medbo, J.I. and O.M. Sejersted. (1990). Plasma potassium changes with high intensity exercise. *J. Physiol. (Lond.)* 421, 105-122.
158. Mejía-Alvarez, R., M. Fill and E. Stefani. (1991). Voltage dependent inactivation of T-Tubular Skeletal Calcium channels in planar lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* 97, 393-412.
159. Miledi, R., I. Parker and P.H. Zhu. (1983). Changes in threshold for calcium transients in frog skeletal muscle fibers owing to calcium depletion in the T-tubules. *J. Physiol. (Lond.)* 344, 233-241.
160. Mobley, B.A. and B.R. Eisenberg. (1975). Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. *J. Gen. Physiol.* 66, 31-45.
161. Moore, L.E., A. Schmid and G. Isenberg. (1984). Linear electrical properties of isolated cardiac cells. *J. Membr. Biol.* 81, 29-40.
162. Murakami, T., H. Ishikawa and L.D. Peachey. (1994). Confocal microscopic 3D visualization of membranous organelles in living cultured fibroblasts. *Bioimages* 2, 21-28.
163. Näbauer, M., G. Callewaert, L. Cleeman and M. Morad. (1989). Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* 244, 800-803.
164. Nakajima, S. and A.L. Hodgkin. (1970). Effect of diameter on the electrical constants of frog skeletal muscle. *Nature* 260, 779-802.
165. Needham, D.M. (1971). *Machina carnis. The Biochemistry of muscular Contraction in its Historical Development*. Cambridge Univ. Press.
166. Nernst, W. (1888). Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper, Theorie der Diffusion. *Zeit. physik. Chem.* 2, 613-637.
167. Neumcke, B. and R. Weik. (1990). Differences between  $K(AATP)$  channels in the surface and transverse tubules of skeletal muscle. *Abstracts 10<sup>th</sup> International Biophysics Congress, Vancouver (Canada)*.
168. Nicola-Siri, L., J. A. Sanchez and E. Stefani. (1980). Effect of glycerol treatment on the calcium current of frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 305, 87-96.
169. Nitsche J. M. and G. Balgi. (1994) Hindered Brownian Diffusion of Spherical Solutes within Circular Cylindrical Pores *Industrial and Engineering Chemistry Research* 33, 2242-2247.
170. Noble, S.J. (1976). Potassium accumulation and depletion in frog atrial muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 258, 579-613.
171. Noma, A. (1983). ATP-regulated single K channels in cardiac muscle. *Nature* 305, 147-148.
172. Nordin, C. (1993). Computer model of membrane current and intracellular  $Ca^{2+}$  flux in the isolated guinea

- pig ventricular myocyte. *Am. J. Physiol. (Lond.)* 265 (*Heart Circ. Physiol.* 34), H2117-H2136.
173. Ogata T. and Y. Yamasaki. (1990) High-resolution scanning electron microscopic studies on the three-dimensional structure of the transverse-axial tubular system, sarcoplasmic reticulum and intercalated disc of the rat myocardium. *Anatomical Record* 228(3), 277-87
174. Page, S.G. (1968). Fine structure of tortoise skeletal muscle. *J. Physiol.* 197, 709-715.
175. Page, S.G. (1969). Structure and some contractile properties of fast and slow muscles of the chicken. *J. Physiol. (Lond.)* 205:131-145.
176. Page, S.G.A. (1965). A comparison of the fine structures of frog slow and twitch muscle fibres. *J. Cell. Biol.* 26, 477-497.
177. Parent, L., and R. Coronado. (1989). Reconstitution of the ATP-sensitive potassium channel of skeletal muscle. Activation by a G protein-dependent process. *J. Gen. Physiol.* 94, 445-463.
178. Paterson, D.J., P.A. Robbins and J. Conway. (1989) Changes in arterial plasma potassium and ventilation during exercise in man. *Respir. Physiol.* 78, 323-330.
179. Peachey, L. D. (1965). The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* 25, 209-231.
180. Peachey, L. D. and R. H. Adrian (1973). Electrical properties of the transverse tubular system. In: Structure and function of muscle. Vol. III. Physiology and biochemistry. G. H. Bourne, editor. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, Inc., New York.
181. Peachey, L.D. (1959). Morphological Pathways for Impulse Conduction in Muscle Cells. New York, Rockefeller Inst., 1959, PhD Thesis.
182. Peachey, L.D. and B. R. Eisenberg. (1978). Helicoids in the T-System and striations of frog skeletal muscle fibers seen by high voltage electron microscopy. *Biophys. J.* 22, 145-154.
183. Peachey, L.D. and Franzini-Armstrong, C. (1978). Observation of the T-System of rat skeletal muscle fibers in three dimensions using high voltage electron microscopy and the Golgi stain (Abstract). *Biophys. J.* 21, 61a.
184. Peachey, L.D. and Franzini-Armstrong, C. 1983. Structure and function of membrane systems of skeletal muscle. In: Handbook of Physiology, Section 10, Skeletal Muscle, Chapter 2, Peachey, L.D., Adrian, R.H. and Geiger, S.R., eds., American Physiological Society, Bethesda, MD, pp. 23-71.
185. Peachey, L.D. and K.R. Porter. (1959). Intracellular impulse conduction in muscle cells. *Science* 129, 721-722.
186. Pette, D. (Editor). (1980). *The plasticity of muscle*. Walter de Gruyter, Inc., Hawthorne, N.Y.
187. Pizarro, G., I. Csernoch, I. Uribe, M. Rodríguez and E. Ríos. (1991). The relationship between  $Q_T$  and calcium release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 97, 913-947.
188. Planck, M. (1890). Ueber die Erregung von Elektrizität und Wärme in Elektrolyten. *Ann. Phys. Chem., Neue Folge* 39, 161-186.
189. Potreau, D. and G. Raymond. (1980). Calcium dependent electrical activity and contraction of voltage-clamped frog single muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 307, 9-22.
190. Qin, D.Y., M. Takano and A. Noma. (1989). Kinetics of ATP-sensitive  $K^+$  channel revealed with oil-gate concentration jump method. *Am. J. Physiol.* 257(5.2), H1624-1633.
191. Ralston A (1965) A first course in Numerical Analysis. McGraw Hill Book Co., Inc. New York.
192. Reger, J. F. (1961). The fine structure of neuromuscular junctions and the sarcoplasmic reticulum of extrinsic eye muscles of *Fundulus heteroclitus*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10(4), Suppl., 111-121.
193. Revel, J.P. (1962). The sarcoplasmic reticulum of the bat cricothyroid muscle. *J. Cell. Biol.* 12, 571-588.
194. Rich, T.L. and G.A. Langer. (1975). A comparison of excitation contraction coupling heart and skeletal muscle, an examination of „calcium induced calcium release“. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 7, 747-765.
195. Ríos, E., M.D. Stern, A. Gonzáles, G. Pizarro and N. Shorokova. (1999). Calcium release flux underlying  $Ca^{2+}$  Sparks of frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 114, 31-48.
196. Robertson, S.P., J.D. Johnson and J.D. Potter. (1981). The time course of  $Ca^{2+}$  exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin and myosin in response to transient increases in  $Ca^{2+}$ . *Biophys. J.* 34, 559-569.
197. Römer, H. and T. Filk. (1994). *Statistische Mechanik*. Weinheim. VCH.
198. Sánchez, J. A. and E. Stefani. (1978). Inward calcium current in twitch muscle fibers of the frog. *J. Physiol. (Lond.)* 283, 197-209.
199. Sánchez, J. A. and E. Stefani. (1983). Kinetic properties of calcium channels of twitch muscle fibers of the frog. *J. Physiol. (Lond.)* 337, 1-17.
200. Santana, L.F., H. Cheng, A.M. Gómez, M.B. Cannell and W.J. Lederer. (1996). Relation between the sarcolemmal  $Ca^{2+}$  current and  $Ca^{2+}$  sparks and local theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circ. Res.* 78, 166-171.
201. Schneider, M. and W. Chandler. (1973). Voltage dependence charge movement in skeletal muscle, a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* 242, 244-246.
202. Schneider, M.F. (1970). Linear electrical properties of the transverse tubules and surface membrane of skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 56, 640-671.
203. Scott, J.B., M. Rudko, D. Radawski and F.J. Haddy. (1970). Role of osmolarity,  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Mg^{++}$ , and  $O_2$  in local blood flow regulation. *Am. J. Physiol.* 218, 338-345.
204. Sjøgaard, G. and A. J. McComas. (1995). Role of interstitial potassium. In: S. C. Gandevia, R. M. Endo, A. J. McComas, D. E. Stuart, C. K. Thomas et al. (eds) *Fatigue. Neural and muscular mechanisms*. Plenum Press, New York. Pp 69-80.
205. Shirikova, N., A. González, W.G. Kirsch, E. Ríos, G. Pizarro, M.D. Stern and H. Cheng. (1999). Calcium sparks, Release packets of uncertain origin and fundamental role. *J. Gen. Physiol.* 113, 377-384.

206. Shirokov, R. G. Ferreira, Y. Jianxun and E. Ríos. (1998). Inactivation of gating currents of L-Type calcium channels. Specific role of the  $\alpha_2\delta$  Subunit. *J. Gen. Physiol.* 111, 807-823.
207. Shirokova, N., J. Garcia, G. Pizarro and E. Rios. 1996.  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum compared in amphibian and mammalian skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 107, 1-18.
208. Simon, B.J. and K. G. Beam. (1985). The influence of transverse tubular delays on the kinetics of charge movement in mammalian skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 85, 21-42.
209. Skinner, N.S. Jr. and W.J. Powell. (1967). Action of oxygen and potassium on vascular resistance of dog skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 212, 533-540.
210. Smith, D.S. (1961). The structure of insect fibrillar flight muscle. A study made with special reference to the membrane systems of the fiber. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10, 123-158.
211. Sommer J.R. and E.A. Johnson. (1979). Ultrastructure of cardiac muscle. In: *Handbook of Physiology, The Cardiovascular System*. edited by R. Burns. American Physiological Society, Bethesda, MD, sec 2., vol. I. chapt. 5. p.113-186.
212. Spruce, A.E., N.B. Standen and P.R. Stanfield. (1985). Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 316, 736-738.
213. Spruce, A.E., N.B. Standen and P.R. Stanfield. (1987). Studies of the unitary properties of adenosine-5'-triphosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 382, 213-236.
214. Squire, J. (1981). *The structural Basis of Muscular contraction*. New York, Plenum.
215. Standen, N.B., A.I. Pettit, N.W. Davies and P.R. Stanfield. (1992). Activation of ATP-dependent  $\text{K}^+$  currents in intact skeletal muscle fibres by reduced intracellular pH. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 247, 195-198.
216. Stanfield, P. R. (1977). A calcium dependent inward current in frog skeletal muscle fibers. *Pflügers Arch.* 368, 267-270.
217. Stöbel, W. (1993). *Fourieroptik: eine Einführung*. Springer. Berlin Heidelberg.
218. Sundell, C.L., Y.E. Goldman and L.D. Peachey. (1986). Fine structure in near-field and far-field laser diffraction patterns from skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 49, 521-530.
219. Takashima, S. and H.P. Schwan. (1974). Passive electrical properties of squid axon membrane. *J. Membr. Biol.* 17, 51-68.
220. Trube, G. and J. Hescheler. (1984). Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflügers Arch.* 401, 178-184.
221. Uttenweiler, D. (1997).  $\text{Ca}^{2+}$  turnover in skinned muscle fibres, a new quantitative approach based on fluorescence imaging and numerical simulation. Heidelberg, 1997. Faculty of Physics and Astronomy. PhD Thesis.
222. Uttenweiler, D. and R.H.A. Fink. (1999) "Mathematical modeling of  $\text{Ca}^{2+}$ -transients measured with fluorescence imaging", in *Handbook of Computer Vision and Applications*, Eds. B. Jähne, H. Haußecker and P. Geißler, *Academic Press*, in press.
223. Uttenweiler, D., C. Weber and R.H.A. Fink (1998) Mathematical Modeling and Fluorescence Imaging to Study the  $\text{Ca}^{2+}$  Turnover in Skinned Muscle Fibers *Biophys. J.* 74, 1640-1653.
224. Valdiosera R., C. Clausen and R. S. Eisenberg. (1974a). Circuit Models of the passive electrical properties of frog skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 63, 432-459.
225. Valdiosera R., C. Clausen and R. S. Eisenberg. (1974b). Impedance of frog skeletal muscle fibers in various solutions. *J. Gen. Physiol.* 63, 460-491.
226. Valdiosera R., C. Clausen and R. S. Eisenberg. (1974c). Measurement of the impedance of frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 14, 295-315.
227. Wagner, J. and J. Keizer. (1994). Effects of rapid buffering on  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion and  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Biophys. J.* 67, 507-530.
228. Wang, Z.M., M.L. Messi and O. Delbono. (1999). Patch-Clamp recording of charge movement,  $\text{Ca}^{2+}$  current and  $\text{Ca}^{2+}$  Transients in adult skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 77, 2709-2716.
229. Woll, K.H., M.D. Leibowitz, B. Neumcke and B. Hille. (1987). A high-conductance anion channel in adult amphibian skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 410, 632-640.
230. Yasuki, K., T. Anno, K. Kamiya, M. R. Boyett, I. Kodama and J. Toyama. (1993). Contribution of potassium accumulation in narrow extracellular spaces to the genesis of nicorandil-induced large inward tail current in guinea-pig ventricular cells. *Pflügers Arch.* 422, 371-379.
231. Yoshioka T., K. Nagami, T. Terao, M. Miyoshi and S. Nakano (1984) Myofibrils and transverse tubules in glycerol-treated frog skeletal muscle. *The Tokai J. Exp. Clin. Med.* 9(5-6), 429-34.
232. Zoghbi, M.E., P. Bolaños, C. Villalba-Galea, A. Marciano, E. Hernández, M. Fill and A.L. Escobar. (2000). Spatial  $\text{Ca}^{2+}$  distribution in contracting skeletal and cardiac muscle cells. *Biophys. J.* 78, 164-173.



## VII. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

Abbildung 1: Abschätzung der Güte der Spannungskontrolle für eine Einzelfaser mit Radius $a=24\text{ }\mu\text{m}$ Links: 3-dimensionale Darstellung (Aus Ehmer, 1997 und Friedrich et al., 1999), rechts: Kontur-Plot.	20
Abbildung 2: Dreidimensionale Darstellung des Potentials $V_{r=a}$ (siehe Glg. 49) über einer Membran eines Zylinders mit spezifischem Widerstand $R_i$ ( $200\text{ }\Omega\text{cm}$ ) und Membranwiderstand $R_m$ ( $1000\text{ }\Omega\text{cm}^2$ ). Der Strom wird durch die Spitze einer Mikropipette geliefert, die in die Faser eindringt (punktförmige Quelle). Die Koordinaten der Quelle sind: $x'=0$ , $\theta'=0^\circ$ , $r'=0.9a$ , Faserradius $a=50\text{ }\mu\text{m}$ . Das Potential wird als radialer Abstand der äußeren Fläche von der Zylinderfläche dargestellt (aus Adrian et al., 1969b).	21
Abbildung 3: Ideale bzw. <i>idealisierte</i> Spannungsklemme (nach [Axonguide, 1993]).	22
Abbildung 4: Konventionelle Zwei-Mikroelektroden Voltage-Clamp (nach Axonguide; 1993). A) Schaltbild, B) Spannungs- und Stromverlauf beim Anlegen der Klemmspannung.	24
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der <i>Vaseline-Gap</i> Methode. Die Faser wird mit Vaseline Streifen bedeckt, somit wird die Meßkammer in vier Kompartimente (A, B, C, und E) geteilt (nach Almers und Pallade, 1981).	27
Abbildung 6: Aufbau einer Skelettmuskelfaser.	30
Abbildung 7: Tubuläres Netzwerk des Froschmuskels (Links: Darstellung nach Peachey, 1965; Rechts: Darstellung nach Franzini-Armstrong, 1980)	32
Abbildung 8: Schnitt durch eine Einzelfaser des <i>M. sartorius</i> ( <i>Rana temporaria</i> ) in Peroxidase-Färbung A) Längsschnitt. Vergrößerung 8000fach. B) Querschnitt in der Nähe der Z-Scheibe. Vergrößerung 8000fach. (Fujimaki et al., 1993) C) Rekonstruktion des TTS einer Froschfaser. Die Tubuli wurden mit der Peroxidase Methode abgefärbt und mit einem Elektronenmikroskop ( $0.7\text{ }\mu\text{m}$ Schickdicke) aufgenommen. 1800-fache Vergrößerung. (Peachey und Eisenberg, 1978).	33
Abbildung 9: Transversaler Schnitt ( $2.5\text{ }\mu\text{m}$ dicke) <i>sternomastoid</i> Muskels der Ratte in Golgi Färbung. Zwei Lagen des T-Systems liegen innerhalb der Schnittscheibe, woraus ein doppeltes Bild entsteht. 9000-fache Vergrößerung. (Peachey und Franzini-Armstrong, 1978)	34
Abbildung 10: Reizweiterleitung durch das TTS in das Innere der Muskelfaser	36
Abbildung 11: Meßkammer für die 2-MVC 2-Mikroelektroden <i>Voltage-Clamp</i> . (nach Friedrich et al., 1999). Schematisches Diagram der Meßkammer und des Schaltkreises für die 2-MVC mit einer zusätzlichen Bad-Klemme. Die Faser wird in der Mitte senkrecht zu den Pipetten ausgerichtet. Somit können die Pipetten senkrecht zur Faserachse eingestochen werden. ME1: Stromapplizierende Mikroelektrode. $V_C$ : Commandopotential, $R_B$ : Bad-Widerstand um den Badstrom $I_{bath}$ zu kompensieren; $R_S$ Spannungsmessende Badelektrode um die Badlösung auf die Spannung $V_{sense}$ zu klemmen.	42
Abbildung 12: Zwei Mikroelektroden nähern sich einer Einzelfaser senkrecht zur Faserlängsachse (Cover Illustration des J. Physiol. 517.3, aus Friedrich, Ehmer und Fink, 1999).	43
Abbildung 13: Pulsprotokoll zur Messung von $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen	44
Abbildung 14: Modell doppelter Stromzirkel (Ehmer, 1997)	47
Abbildung 16: Schematische Zeichnung einer Muskelfaser. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt, daß die L- Type DHP $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (rot) nur im TTS vorhanden sind. Die $\text{Na}^+$ und $\text{K}^+$ Kanäle leiten das Aktionspotential in das TTS weiter (siehe auch Seite35). Die Verengung am Eingang des TTS führt zu einem verminderten Diffusionszugang, der im Ersatzschaltbild durch einen Eingangswiderstand $r_3$ repräsentiert wird.	52
Abbildung 17: Scheibenmodell des TTS. Im vereinfachten Modell mit Zylindergeometrie wird das gesamte TTS in einer homogenen Scheibe mit äquivalenten Leitfähigkeiten repräsentiert. (Abb. Links nach Krstic, 1976).	53
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Konzentrationsverteilung bei Verarmung (links) und Anreicherung (rechts).	54
Abbildung 19: Ersatzschaltbild (aus Ehmer et al., 2000).	55
Abbildung 20: Modell zur intrazellulären Kaliumkonzentrationsänderung, hervorgerufen durch den Fluß durch die Oberflächenmembran und den Strom durch die TTS Membran.	66
Abbildung 21: Links: Scheibenmodell ohne (oben) und mit (unten) radialer Leckleitfähigkeit, rechts: qualitative Konzentrationsverteilung.	76
Abbildung 22: Screenshot der Tracer Software. Eingelesenes Bild und zugehörige Koordinaten.	79
Abbildung 23: Graphische Ausgabe der digitalisierten Meßwerte (Tracer Vers. 1.0).	80

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 24: Schematische Darstellung der zusätzlichen Komponenten bei Depolarisation.	85
Abbildung 25: Schematischer Aufbau zur Messung der extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit konfokaler Mikroskopie (aus Feierabend, 1999).	86
Abbildung 26: A) Struktur und B) Spektrum des Fluoreszenzfarbstoffs X-Rhod 5-N (Molecular Probes)	87
Abbildung 27 Vergleich der Simulationsergebnisse (Symbole) mit der exakten analytischen Lösung (durchgezogene Linien) der radialen Konzentrationsverteilung $c(r)$ im TTS für verschiedene Zeiten.	92
Abbildung 28: Links: Resultierende ohmsche Stromantwort beim Anlegen einer Rechteckspannung an eine Membran. Rechts: idealisierte Antwort. Die Zeitdauer beträgt 100 willkürliche Einheiten, $RC=10$ willkürliche Einheiten.	94
Abbildung 29: Einfluß der Frequenz der angelegten Spannung auf den Stromverlauf.	95
Abbildung 30: Einfluß der Konzentrationsänderung im TTS auf den zeitlichen Verlauf einer idealisierten Stromantwort (oben) und einer "realen" Stromantwort (unten) für verschiedene $f_T$ zwischen 0.01% und 99.99%.	96
Abbildung 31: Anteil des TTS-Volumens von $\rho=0.1\%$ bis $\rho=5\%$ am Gesamtvolumen der Faser.	98
Abbildung 32: Einfluß des Faserradius von $a=7.5\ \mu\text{m}$ bis $a=100\ \mu\text{m}$ bei einer fest vorgegebenen Stromdichte.	99
Abbildung 33: Einfluß des Faserradius von $a=7.5\ \mu\text{m}$ bis $a=100\ \mu\text{m}$ , die Stromdichte variiert mit dem Radius, Annahme: gleiche Flächenleitfähigkeit im TTS.	101
Abbildung 34: Einfluß des Eingangswiderstandes von $r_s=0\ \Omega\text{cm}^2$ bis $r_s=1000\ \Omega\text{cm}^2$ .	102
Abbildung 35: Einfluß der initialen Ionenkonzentration von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}=1\ \text{mM}$ bis $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}=100\ \text{mM}$ . Vereinfachte Annahme: Keine Auswirkung auf die Stromdichte $I_{\text{Ca}}$ und auf das Gleichgewichtspotential $E_{\text{Ca}}$ .	105
Abbildung 36: Stromdichte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ladungsträger und des veränderten Gleichgewichtspotentials $E_{\text{Ca}}$ .	106
Abbildung 37: Einfluß der initialen Ionenkonzentration von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}=1\ \text{mM}$ bis $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}=100\ \text{mM}$ unter Berücksichtigung der Auswirkung auf die Amplitude der maximalen Stromdichte $I_{\text{Ca}}$ und auf das Gleichgewichtspotential $E_{\text{Ca}}$ .	107
Abbildung 38: Einfluß der <i>driving force</i> $V_{\text{clamp}}-E_{\text{rest}}$ von +20 mV bis -194 mV. Konstante Leitfähigkeit	108
Abbildung 39: Einfluß der <i>driving force</i> $V_{\text{clamp}}-E_{\text{rest}}$ für Spannungen $V_{\text{clamp}}$ von -50 mV bis +75 mV auf die mittlere Konzentration (links) und den Stromverlauf (rechts) für unterschiedliche Spannungsabhängigkeiten der Leitfähigkeit.	109
Abbildung 40: Experimentelle $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme, verspätete Aktivierung durch Konzentrationsänderungen an einer Einzelfaser in Hypertoner Lösung, Länge 595 $\mu\text{m}$ , Radius 21 $\mu\text{m}$ (nach Fig. 11A Friedrich et al., 1999)).	110
Abbildung 41: Typischer Stromverlauf bei einer Messung der $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme einer Einzelfaser des <i>M. interosseus</i> Einzelfaser in ungepufferter (Kreise, oben) und in gepufferter (Quadrate, unten) 10 mM $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung bei 23°C.	112
Abbildung 42: Simulations-Input $I_{\text{exp}}^{\text{buff}}(t)$ (Quadrate), Output $I_{\text{sim}}^{\text{unbuff}}(t)$ (rote Linie) und Vergleich mit der Messung $I_{\text{exp}}^{\text{unbuff}}(t)$ (Kreise) in ungepufferter 10 mM $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung bei 23°C.	113
Abbildung 43: Bestimmung der Simulationsparameter aus dem Wertebereich. 10 Schritte für $\rho$ , 4 Schritte für $r_s$ . A) Zeitverlauf der Ströme, B) Mittlerer quadratischer Fehler C) Parametervergleich (1/Fehler).	114
Abbildung 44 Messung und Simulation einer repräsentativen Einzelfaser bei 30°C. Faserparameter: Radius $a=24\ \mu\text{m}$ , Länge $l=640\ \mu\text{m}$ . Eingangswiderstand $r_s=120\text{-}30\ \Omega\text{cm}^2$ , $\rho=0.007\text{-}0.0055$ . (Faser f22o99). Zeitliche Entwicklung der experimentellen Ströme in gepufferter Lösung (Quadrate, links) bei -20 mV (schwarz), 0 mV (rot) und +20 mV (grün) und in ungepufferter Lösung (Kreise, rechts). B) Vergleich von Messung und Simulation (Linie) für jedes Kommando-Potential (-20 mV links, 0 mV mitte und +20 mV rechts). Hier wurde wiederum der gepufferte Strom als Simulationsinput benutzt.	115
Abbildung 45 Vergleich der Zeitkonstanten für Kommando-Potentiale von 0 mV (links) und +20 mV (rechts) in ungepufferter (massiv) und gepufferter (///) Lösung. Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.	116
Abbildung 46 Messung und Simulation einer weitem Einzelfaser bei 30°C. Faserparameter: Radius $a=24\ \mu\text{m}$ , Länge $l=560\ \mu\text{m}$ . Eingangswiderstand $r_s=0\text{-}50\ \Omega\text{cm}^2$ , $\rho=0.006$ . (Faser f21o99) A) Zeitliche Entwicklung der experimentellen Ströme in gepufferter Lösung (Quadrate, links) 0 mV (rot) und +20 mV (grün) und in ungepufferter Lösung (Kreise, rechts). B) Vergleich von Messung und	

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Simulation (Linie) für jedes Kommando-Potential (0 mV links und +20 mV rechts). Hier wurde wiederum der gepufferte Strom als Simulationsinput benutzt. _____	117
Abbildung 47 Simulierte Konzentrationsverteilung einer repräsentativen Einzelfaser, links 0 mV, rechts: +20 mV. (Faser f_99O22, siehe weiter oben) _____	119
Abbildung 48: Zeitliche Entwicklung der Pufferwirkung bei einer Temperatur von T=23°C (oben) und bei T=10°C (unten). _____	120
Abbildung 49: Experiment (Symbole) und Simulation (Linien) von Froschfasern mit der <i>Vaseline-Gap</i> Methode in intrazellulär gepufferter Lösung (Experimentelle Daten aus Almers et al., 1981). _____	121
Abbildung 50: Experiment (schwarz) und Simulation (rot) von Froschfasern mit der <i>Vaseline-Gap</i> Methode in intrazellulär gepufferter Lösung (Experimentelle Daten aus Almers et al., 1981). Weiterhin wurde der Einfluß einer zusätzlichen intrazellulären Konzentrationsänderung simuliert (grün). Oben: Stromverlauf, unten: Konzentrationsänderung intrazellulär (untere Kurven) und extrazellulär (obere Kurven). Links und Mitte: Standard Pulsprotokoll. Rechts: Tail-currents. Faserparameter: $a=70\text{ }\mu\text{m}$ , $r_s=20\text{ }\Omega\text{cm}^2$ . _____	122
Abbildung 51 Abweichender Verlauf von Messung und Simulation bei einer simulierten Konzentrationsverteilung mit zusätzlicher intrazellulärer Konzentrationsänderung (A, links) bei Experimenten an intakten kontrahierenden Fasern (Faser f_99O22, Depolarisation auf 0 mV, siehe weiter oben). Im Vergleich ist in B, rechts) die Simulation ohne zusätzliche intrazelluläre Konzentrationsänderung dargestellt. _____	123
Abbildung 52 Abweichende Ergebnisse von Messung und Simulation einer Einzelfaser bei 23°C. Bei einigen Fasern wurde ein "Wiederanstieg" der Stromamplitude nach etwa 400-500 msec beobachtet (Pfeile). Möglicherweise handelt es sich allerdings um ein Überschießen der Inaktivierung, die durch einen unspezifischen Ausstrom vorgetäuscht werden könnte, weiters siehe Text. Faserparameter: Radius $a=21\text{ }\mu\text{m}$ , Länge $l=560\text{ }\mu\text{m}$ . Eingangswiderstand $r_s=200\text{ }\Omega\text{cm}^2$ , $p=0.014$ . (Faser f_9o99) _____	124
Abbildung 53: Mögliche Erklärung für den „Wiederanstieg“ des Calciumstroms nach ca. 400-500 msec (Pfeil). Gezeigt ist ein vereinfachter $\text{Ca}^{2+}$ -Strom (schwarze Linie), ein unspezifischer Ausstrom (rote Linie) und die Summe der beiden links gezeigten Ströme (grüne Linie). _____	125
Abbildung 54 Aufgrund der mehrfachen Lösungswechsel und der massiv erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration war bislang nur eine einzige Messung möglich. Eine begründete Aussage für oder gegen die Annahme kann daher nicht getroffen werden. _____	126
Abbildung 55: Fluoreszenzsignal eines transversaler Schnitts durch eine Skelett-Muskelfaser ( <i>M. interosseus</i> ) in isotoner $\text{Ca}^{2+}$ -Fluoreszenzlösung. A) Originalbild, B) Negativbild. Bildausschnitt: $150\text{ }\mu\text{m} \times 150\text{ }\mu\text{m}$ _____	127
Abbildung 56: Zweikanalaufnahme des Reflektionsbildes (links) und des Fluoreszenzsignals (rechts) einer Muskelfaser ( <i>M. interosseus</i> ) in isotoner $\text{Ca}^{2+}$ -Fluoreszenzlösung. A) Originalbild, B) Negativbild. _____	128
Abbildung 57: Zeitliche Entwicklung der Farbstoffeindiffusion in das TTS. Der Lösungswechsel findet zum Zeitpunkt $t=0$ statt und ist im Bild links oben gezeigt. Die Linie im Bild rechts unten bezeichnet die ROI für die folgende Auswertung. _____	129
Abbildung 58: Radiales Fluoreszenzprofil für die oben ausgewählte ROI im Falschfarbenkonturplot (rot=100%, blau=0%). _____	130
Abbildung 59 Beispiel einer während der Messung zerstörten Faser (xy-z Scan) _____	131
Abbildung 60 Messung von $\text{K}^+$ -Strömen einer Froschfaser mit der 3-MVC Methode. Gezeigt sind die Spannungen $V_1$ und $V_2$ and den Elektroden (1) und (2) (siehe Methoden). Radius $a=50\text{ }\mu\text{m}$ , der Abstand der Elektroden beträgt $250\text{ }\mu\text{m}$ . Innenwiderstand der Faser $R_i=310\text{ }\Omega\text{cm}$ . Temperatur $T=4^\circ\text{C}$ . _____	133
Abbildung 61 Abweichungen zwischen experimentellen Daten (offene Kreise) und der Simulation (Linien), die aus einer zu stark vereinfachten Betrachtungsweise (sog. "erste Näherung") resultieren. Die Ergebnisse der "kompletten, korrekten Beschreibung" sind in Abbildung 67 dargestellt. Bei Hyperpolarisation ist die Abnahme viel zu stark. Daher muss in weiteren Simulationen eine Modifikation durchgeführt werden (siehe Text). Gezeigt sind die Simulation in erster Näherung im Vergleich zur Messung der $\text{K}^+$ -Ströme. Die Abweichungen werden in der DISKUSSION behandelt. Links: Depolarisation, rechts: Hyperpolarisation. _____	134
Abbildung 62 Werte des Bruchteils $p$ am Gesamtvolumen der Faser in dem es zu Konzentrationsänderungen kommt, für große Stromdichten wird zusätzlich zum TTS-Volumen auch ein kleiner Bereich an der Faseroberfläche beeinflusst. _____	135
Abbildung 63 Interessanterweise tritt eine Verbesserung der Übereinstimmung der Simulationsergebnisse (Linien) mit den experimentellen Ergebnissen (offenen Kreise) bei der Simulation der $\text{K}^+$ -Ströme mit einem variablen $p$ auf, deutlicher im Bereich der Hyperpolarisation (siehe Text). Auf die Amplitude der Depolarisation und den schnellen Verlauf bei kleinen Hyperpolarisationen	

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

hat diese Änderung nur einen geringen Einfluß und führt nur zu geringen Verbesserungen.	
Bemerkenswert ist die annähernd korrekte Wiedergabe der <i>Tail-currents</i> .	136
Abbildung 64 Verbesserung der Übereinstimmung der Simulation (Linien) der $K^+$ -Ströme für eine variable Kanaldichte $\vartheta$ im TTS im Vergleich mit der Messung (offene Kreise) der $K^+$ -Ströme. Oben: $\vartheta = 20\%$ , unten $\vartheta = 60\%$ . Inkrement: 10%.	137
Abbildung 65 Getrennte Untersuchung einer zusätzlichen Konzentrationsänderung an der ASM-Membran. Simulation (Linien) und Vergleich mit der Messung (offene Kreise) der $K^+$ -Ströme für eine Kanaldichte von $\vartheta = 20$ (Links) $\vartheta = 30$ (Mitte) und $\vartheta = 40\%$ (Rechts).	138
Abbildung 66: Resultierende Konzentration im TTS (links) und in der Nähe der ASM-Membran (rechts). Im unteren Teil wurde eine logarithmische Darstellung gewählt.	139
Abbildung 67 Sehr gute Übereinstimmung der Simulation (Linien) mit den Messungen (Symbole) durch zusätzliche Stromkomponenten: Inaktivierung bei Depolarisation und zusätzlicher Strom durch den <i>Delayed Rectifier</i> bei Depolarisation. $\vartheta = 30$ (Mitte) und $\vartheta = 40\%$ (Rechts).	140
Abbildung 68: Getrennte Untersuchung der Tailcurrents bei unterschiedlicher Depolarisationsdauer. Messung mit der 3-MVC Methode (Fink & Wettwer, unpublizierte Daten).	141
Abbildung 69: Simulation der Tailcurrents bei unterschiedlicher Depolarisationsdauer. Oben: Ströme, Unten: Berechnete Konzentration im TTS.	142
Abbildung 70: Messung der Tailcurrents bei unterschiedlicher Prepulsdauer. Oben ist die Spannung $V_2$ , unten die Kontrollspannung $V_1$ aufgetragen- (Fink und Wettwer, unpublizierte Daten).	143
Abbildung 71: Simulation der Tailcurrents bei unterschiedlicher Prepulsdauer. Oben: Ströme im TTS, Unten: Vergrößerte Skala.	144
Abbildung 72: Differenzen der Anfangsamplitude und der Amplitude im " <i>steady-state</i> " der Tailcurrents bei unterschiedlicher Prepulsdauer. Krise: 10 msec, Dreieck nach oben: 50 msec, Dreieck nach unten: 300 msec Prepuls.	145
Abbildung 73: Simulation der Ströme und Konzentrationen für eine initiale extrazelluläre Kaliumkonzentration von 80 mM. Oben: ohne Änderung der intrazellulären Konzentration, unten: mit Änderung.	146
Abbildung 74: Simulation der Ströme und Konzentrationen für eine initiale extrazelluläre Kaliumkonzentration von 80 mM. Oben: ohne Änderung der intrazellulären Konzentration, unten: mit Änderung.	147

## Tabellen

Tabelle 1: Symbole, die in der Kabeltheorie benutzt werden	17
Tabelle 2: Prozentualer Anteil des TTS Volumens am Faservolumen und Flächendichte (Verhältnis von der TTS-Oberfläche zum TTS-Volumen).	35
Tabelle 3: Zusammenstellung der in der mathematische Modellierung benutzten Variablen.	48
Tabelle 4: Buffer-Parameter zur intrazellulären Konzentrationsänderung.	65
Tabelle 5: Allgemeine Umgebungsparameter zur Simulation in Abschnitt B und C.	90
Tabelle 6: Parameter der Modellfaser zur Simulation in Abschnitt B	90
Tabelle 7: Mittlere Konzentration, Stromdichte, Konzentration bei $r=a$ und $r=0$ im <i>steady-state</i> für unterschiedliche Werte des Eingangswiderstands $r_s$ .	103
Tabelle 8: Faserparameter und Werte für Messungen und Simulationen in isotoner Lösung.	118

## VIII. Eigene Veröffentlichungen

### 1. Originalarbeiten

Friedrich, O., T. Ehmer, and R.H.A. Fink (1999). Calcium currents during contraction and shortening in enzymatically isolated murine skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology* **517.3**: 757-770.

Ehmer, T., O. Friedrich, D. Uttenweiler, P.H. Barry, and R.H.A. Fink. (2000). Numerical analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  depletion in the transverse tubular system (TTS) of mammalian muscle. (Manuskript eingereicht).

Ehmer, T., E. Wettwer and R.H.A. Fink. (2000). Reconstruction of the  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel density by numerical analysis of  $\text{K}^{+}$  depletion in exhausted muscle fibres of the frog. (Manuskript eingereicht).

E. Wettwer, T. Ehmer and R.H.A. Fink. (2000). Potassium currents in exhausted skeletal muscle fibers of the frog. (Manuskript eingereicht).

### 2. Abstracts

Ehmer, T., O. Friedrich, R.H.A. Fink (1999).  $\text{Ca}^{2+}$  depletion in the transverse tubular system of mammalian single skeletal muscle fibres: numerical simulation vs. experimental results. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **20(1)**: 90.

Friedrich, O., T. Ehmer, and R.H.A. Fink. (1999). Speed of shortening of voltage clamped enzymatically isolated toe muscle fibres of the mouse. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **20(1)**: 91.

## IX. Anhang

```

/*
  Filename: ca_in.c
          unix - code

          last mod:   Apr.10.2000

  description:
    calculates effect of depletion that can be compared with
    experimental data in unbuffered Ca-solution
    calculates from data obtained in buffered solution, where
    depletion is suppressed

    based on algorithm from
    P. Barry 73 - FORTRAN IV

    translated to C++ Aug. 96

  Author:   Thomas Ehmer
*/

#include <time.h>
#include <math.h>
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>
#include <limits.h>
#include <stdlib.h>
#include <string.h>

/* Program - constants */
#define Pi 3.1415926535897932385 // Pi
#define MAXIT 500000 // Numer of maximal Iterations */
#define ANZ_R 100 // max. number of rings */
#define ANZ 10000000
#define PLOTPOINTS 100000
#define dt_factor 100 // every dt step is divided in dt_factor steps
#define time_factor 1000 // input time div. by time_factor is realtime
#define current_factor 1e6 //was 1e9 // input current div. by factor is
real current

/* Program variables */

int scr_c=0; // flag for Cn - screen output 1=ON,0=OFF*/
int prn_c=0; // flag for Cn - file output */
int scr=1; // flag screen time output
int surface_flag=1; // input current is yet given as current density (in
A/cm^2) 1=YES, 0=NO
int fitflag=1; // fitfunction IV: 1=linear gk, 2=sigmoid, 3=dietze
int PP_flag=0; // flag Pulse-protocol 1=ON, 0=OFF

double rts,gkt,rm,zim,st,cavr;
double b;
double ct[ANZ_R],zk1[ANZ_R],zk2[ANZ_R],zk3[ANZ_R],zk4[ANZ_R],ft[ANZ_R];
double zit[ANZ_R],zir[ANZ_R],v[ANZ_R],rfac[ANZ_R],zifac[ANZ_R];
double dc[ANZ_R],a1[ANZ_R],a2[ANZ_R],a3[ANZ_R];
double c[ANZ_R];
double znf,gl,zmu,rtf,clfac,dt,zi0,rsm,gk1,gk2,gk3,gk4;
double vo,vo_min,vo_max,vo_step,zi,c_in,c_in_t;
double t,dr,start_time,end_time;
double D,gbw,tf,min;
int kt,k,n,m,ml,nt,lauf,num;

FILE *fhandle,*f_out,*f_in,*f_para,*f_rad,*f_nin;

```

## Anhang

```
char* in_name="/usr/people/tomi/simulation/data/input/ca/test.dat";
char out_name[150],para_name[150],rad_name[150],nin_name[150];
char pathname[100]="/usr/people/tomi/simulation/data/output/";
char f_name[20]="f22o99_inc";

/* Definitions for physical constants etc.*/

#define F      96484 // FARADAY - Constant C/mol
#define R      8.3144 // Gas-const. J mol-1 K-1
#define T      283.45 // 2 Celsius - roomtemperature <----- modify!
#define RTF    R*T/F // R*T/F
#define D      670e-8 // Diffusion coeff. of Ca+ in lumen of TTS [cm^2 sec^(-1)]
                1µm^2=1e-8cm^2

// barry polynom (=1)
#define gk1 1
#define gk2 0
#define gk3 0
#define gk4 0

// wettwer sigmoid (=2)
double A1 = -1126.0; // Sigmoide Kennlinie, Boltzman fit konstanten
double A2 = 1304.45;
double xo = -71.5;
double dx = 56.4;

// dietze DHP (=3)
double dhp_norm=-20.567; //normalize relative conductance to 1
double dhp_v05=2.2e-3;
double dhp_k=6.3e-3;
double dhp_vca=70e-3;

/* fiber parameters*/
double co=10e-6; // external K-concentration. [mM]
double c_in_init=1e-10;
double a=24e-4; // fiber radius [cm]
double f_T=0.999; // fraction of current passing through the TTS

double sigma =0.375; // network factor for TTS
double rho=0.006; // fraction of fibervolume occupied by TTS
double gbl=1.5e-5; // effectice radial conductance of TTS lumen per unit
volume
double ra=0; // total membrane resistance per unit survace area [ohm cm^2]
double fiber_length=640e-4; // fiberlength in µm

double surface=2*Pi*a*fiber_length;
double norm_factor=1.0;

float tau_act=0e-3;
double Ek=144e-3;
double E_rest = Ek;

// ---- simulation - parameters -----
double error=1e-9;
double sp[20];
#define anz_pr 1 // number of voltage steps */
#define m_min 40 // min number of rings */
#define m_max40 // max number of rings */
#define m_step 20 // step rings*/
#define nt dt_factor // print out every nt-th value */
#define znf 1 // factor for increasing gbl */

double t0=0; /* start time */
double dt_vp=1e-8; /* step width delta_time@pulse*/
```

```

double dt_p=1e-7;
double dt_m=1e-6; /* step width delta_time@0mV */
double tfvp=0; /* end time prepulse*/
double tfp=1.102; // testpulse time
double tfm=1.1025; /* end time simulation */

signed int v_count,m25,m50,m75,i,err;
double am,sm,vmek_s,gkt_s;
double tot_time=0,prot_time=0;

float tim[ANZ],curr[ANZ],gbw_t[ANZ],rsm_t[ANZ];

// dateilesen ect. in file.h header datei

void radwrite() // output radial concentration in file.RAD
{
    f_rad=fopen(rad_name,"w");
    if (f_rad==NULL)
    {
        printf("ERROR, cannot open %s as radial output
file.\nExit.\n\n",rad_name);
        exit(1);
    }
}

void filenames(int lauf)
{
    char nummer[10];
    char buffer[140];

    sprintf(nummer,"%i",lauf);
    strcpy(out_name,pathname);
    strcat(out_name,f_name);
    strcat(out_name,nummer);
    strcpy(para_name,out_name);
    strcpy(rad_name,out_name);
    strcpy(nin_name,out_name);
    strcat(out_name,".dat");
    strcat(rad_name,".rad");
    strcat(para_name,".par");
    strcat(nin_name,"_in.dat");

    printf("\n---- Filenames ----\n");
    printf("Name of inputfile: %s\n",in_name);
    printf("outputname : %s\n",out_name);
    printf("Radialfilename : %s\n",rad_name);
    printf("Parameterfilename: %s\n",para_name);
    printf("Norm_input : %s\n",nin_name);
}

int datein()
{
    int OK=0; // Flag for correct fileinput
    int count=0; // Laufvariable

    if( (f_in = fopen( in_name, "r" )) == NULL )
    {
        printf( "\n\nERROR:The file %s was not opened\n",in_name );
        OK=0;
        printf("\nEnd.\n");
        exit(1);
    }
}

```



## Anhang

```
else
{
    printf( "The file %s was opened for input\n" ,in_name);
    OK=1;
}
if (OK)
{
    /* Set pointer to beginning of file: */
    f_nin=fopen(nin_name,"w");
    fseek( f_in, 0L, SEEK_SET );
    count=0;
    while( !feof( f_in ) )
    {
        fscanf(f_in,"%f",&tim[count]);
        fscanf(f_in,"%f",&curr[count]);
        tim[count]=tim[count]/time_factor;
        curr[count]=curr[count]/(float)current_factor;
        if (surface_flag==0)
            curr[count]=curr[count]/surface*norm_factor;
        printf("time: %g, current ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ):%g\n",tim[count],curr[count]*1e6);
        fprintf(f_nin,"%g %g\n",tim[count],curr[count]*1e6);
        count++;
    }
    fclose(f_in);
    fclose(f_nin);
}
count--;
start_time=tim[0];
end_time=tim[count-1];
dt=(tim[2]-tim[1])/dt_factor;
return count;
}

// ende dateikram

void input_convert(int maxnumber,double spannung) // norm input current
{
    int i,wert;
    double min_value=0,rm_local,gt_local;

    for(i=0;i<=maxnumber;i++)
    {
        rm_local=spannung/curr[i];
        gt_local=f_T/rm_local;
        rsm_t[i]=rm_local/(1-f_T);
        gbw_t[i]=2/(a*(1/gt_local-(a/(4*gb1))-ra));
    }
    wert=int(maxnumber/2);
    rm=spannung/curr[1];
    rsm=rsm_t[1];
    gbw=gbw_t[1];
    printf("wert:%i, rm:%g, rsm:%g, gbw:%g",wert,rm,rsm,gbw);
}

void parawrite() // output as .par file
{
    f_para=fopen(para_name,"w");
    if (f_para==NULL)
    {
        printf("Error, cannot open %s as parameter output
file.\nExit.\n\n",para_name);
        exit(1);
    }
    printf("\n\nDateinamen : \nEingabe Messdaten:%s\nAusgabe Daten :
%s\nAusgabe Parameter:%s\n\n",in_name,out_name,para_name);
}
```

```

    printf("Co(mM): %g, E_rest(mV):%g, Fibre radius(μm):%g, activation
tau(sec): %g\n",co*1e6,E_rest*1e3,a*1e4,tau_act);
    printf("sigma:%g, rho:%g, rsm(ohm cm^2):%g, ra(ohm cm^2):%g,
gbw(mmho/cm^3):%g, dr(μm):%g\n\n",sigma,rho,rsm,ra,gbw*1e3,dr*1e4);
    if (surface_flag==0)
        printf("surface membrane (μm^2):%g\n",surface*1e8);
    else if (surface_flag==1)
        printf("currents in input file are given in A/cm^2\n");

    fprintf(f_para,"Dateinamen : \nEingabe Messdaten:%s\nAusgabe Daten :
%s\nAusgabe Parameter:%s\n",in_name,out_name,para_name);
    fprintf(f_para,"dt_factor: %i, rings: %i, err: %g\n",dt_factor,m,error);
    fprintf(f_para,"Peak_current: %g, Co(mM): %g, E_rest(mV):%g, Fibre ra-
dius(μm):%g, activation tau(sec): %g\n",min,co*1e6,E_rest*1e3,a*1e4,tau_act);
    fprintf(f_para,"sigma:%g, rho:%g, rsm(ohm cm^2):%g, ra(ohm cm^2):%g,
gbw(mmho/cm^3):%g, dr(μm):%g D(μm^2/s:%g, gbl:%g \ndt_factor:%i
time_factor:%i
dt:%f\n",sigma,rho,rsm,ra,gbw*1e3,dr*1e4,D*1e9,gbl,dt_factor,time_factor,dt);
    if (surface_flag==0)
        fprintf(f_para,"surface membrane (μm^2):%g\n",surface*1e8);
    else if (surface_flag==1)
        fprintf(f_para,"currents in input file are given in A/cm^2\n");
    fclose(f_para);
}

void current(double time) /* ----- subroutine for caluclating current*/
{
    double dum[ANZ_R],vmek=0,gkt=0,x=0,g=0;
    double nenn,zaehl,di=0,er=1;

    for (n=1; n<=m; n++)
        dum[n]=(long double)vo-(long double)RTF*log(c[n]/co);

    if (time<=tim[lauf])
    {
        gbw=gbw_t[lauf];
        rsm=rsm_t[lauf];
    }
    if (time>tim[lauf])
    {
        lauf++;
        gbw=gbw_t[lauf];
        rsm=rsm_t[lauf];
    }
    k=0;
    // activation shift
    if (tau_act>0)
        if (time>0)
        {
            gbw=gbw*(1-exp((-time)/tau_act));
            // printf("\ng: %f\n",g);
        }

    // end of activation shift
    while((er-error)>0)
    {
        k++;
        v[1]=-zi*(ra+rfac[1]);
        vmek=dum[1]-v[1];

        if (fitflag==1)
            gkt=(long double)gk1+(long double)gk2*vmek+(long dou-
ble)gk3*vmek*vmek+(long double)gk4*vmek*vmek*vmek;
        else if (fitflag==2)
        {
            x=(vmek+Ek)*1e3;

```

## Anhang

```

nenn=-(A1-A2)*exp((x-xo)/dx);
zaehl=10.8*dx*pow(1+exp((x-xo)/dx),2);
gkt=nenn/zaehl;
}

if (fitflag==3)
{
x=(vmek+Ek);
gkt=(x-dhp_vca)/(1+exp((dhp_v05-x)/dhp_k))*dhp_norm;
}

zit[1]=-zifac[1]*vmek*gkt*gbw;
zir[1]=zi-zit[1];
for (n=2; n<=m1; n++)
{
v[n]=v[n-1]-zir[n-1]*rfac[n];
vmek=dum[n]-v[n];
if (fitflag==1)
gkt=(long double)gk1+(long double)gk2*vmek+(long double)gk3*vmek*vmek+(long double)gk4*vmek*vmek*vmek;
else if (fitflag==2)
{
x=(vmek+Ek)*1e3;
nenn=-(A1-A2)*exp((x-xo)/dx);
zaehl=10.8*dx*pow(1+exp((x-xo)/dx),2);
gkt=nenn/zaehl;
}
else if (fitflag==3)
{
x=(vmek+Ek);
gkt=(x-dhp_vca)/(1+exp((dhp_v05-x)/dhp_k))*dhp_norm;
}

zit[n]=-zifac[n]*vmek*gkt*gbw;
zir[n]=zir[n-1]-zit[n];
};
v[m]=v[m1]-zir[m1]*rfac[m];
vmek=dum[m]-v[m];
if (fitflag==1)
gkt=(long double)gk1+(long double)gk2*vmek+(long double)gk3*vmek*vmek+(long double)gk4*vmek*vmek*vmek;
else if (fitflag==2)
{
x=(vmek+Ek)*1e3;
nenn=-(A1-A2)*exp((x-xo)/dx);
zaehl=10.8*dx*pow(1+exp((x-xo)/dx),2);
gkt=nenn/zaehl;
}
else if (fitflag==3)
{
x=(vmek+Ek);
gkt=(x-dhp_vca)/(1+exp((dhp_v05-x)/dhp_k))*dhp_norm;
}
gkt_s=gkt;
vmek_s=vmek;

zit[m]=-zifac[m]*vmek*gkt*gbw;
di=zir[m1]-zit[m];
er=fabs(di)/fabs(zi);

/* call ATP-pump routine (to be modified!)*

if(k == MAXIT)
{
printf("\n\nERROR: Iteration did not converge ");
printf("(after %i Iterations).\n\nProgram halted.\n",MAXIT);
exit(1);
}

```

```

    }

    if ((er-error) > 0) zi-=di/6; /* repeat while loop*/

};

}; /* ----- end of "current" */

void dcndt(double h) /* ----- subroutine for calculating dCn/dt*/
{
    double dcs;
    double b1,c1;

    dcs=c[1]-c[2];
    c1=c[1]+dcs*clfac;
    b1=a1[1]*(co-c1);
    dc[1]=b1-a2[1]*dcs-h*zit[1]*a3[1];
    for(n=2;n<=m1;n++)
    {
        b1=a1[n]*(c[n-1]-c[n]);
        dc[n]=b1-a2[n]*(c[n]-c[n+1])-h*zit[n]*a3[n];
    };
    b1=a1[m]*(c[m1]-c[m]);
    dc[m]=b1-h*zit[m]*a3[m];
}; /* ----- end of "dcndt"*/

int main(void) /* ----- MAIN PROGRAM
{
    double x,zaehl,nenn;
    /* intitalize voltage amplitude */
    sp[1]=0e-3;
    sp[2]=-64e-3;
    sp[3]=-48e-3;
    sp[4]=-32e-3;
    sp[5]=-16e-3;
    sp[6]=16e-3;
    sp[7]=32e-3;
    sp[8]=48e-3;
    sp[9]=64e-3;
    sp[10]=80e-3;
    sp[11]=96e-3;
    /*end of init*/

    rm=0; zim=0; gkt=0; rts=0; cavr=0;
    Ek=RTF/2*log(co/c_in_init);
    for(m=m_min; m<=m_max; m+=m_step)
    {
        for(v_count=1; v_count<=anz_pr; v_count++)
        {
            dr=a/double(m);
            vo=sp[v_count]-Ek;
            filenames(v_count); // filenames einrichten

            f_out=fopen(out_name,"w");
            if (f_out==NULL)
            {
                printf("ERROR, cannot open %s as outputfile\n",out_name);
            }
            fclose(f_out);
            num=datein();
            printf("Hallo.\nWir haben heute %i Messdaten eingelesen.\n",num);
            printf("Noch einen Schoenen TAG!\n\n");
            input_convert(num,vo);

```

## Anhang

```
parawrite();

printf("Startzeit: %f\nEndzeit: %f, dt:%g\n\n",start_time,end_time,dt);
// fprintf(f_para,"\nactual clamp voltage :%f", vo);
// fprintf(f_para,"\nactual number of rings :%i\n",m);
printf("Simulation %f mV ...\n",vo*1e3);
kt=0;
zir[m]=0.0;
ml=m;
ml--;
/* starting condition*/
for (n=1; n<=m; n++)
    ct[n]=co;
c_in_t=c_in_init;
for (n=1;n<=m;n++)
{
    ft[n]=(m-n)+0.5;
    zifac[n]=dr*dr*ft[n]/a;
a3[n]=a/(rho*F*dr*dr*ft[n]);
};

if (abs(ra) <= 1e-6)
{
    zmu=dr/2;
    clfac=0.0;
}
else
{
    zmu=ra*gbl;
    clfac=0.5;
};
for(n=1;n<=m;n++)
{
    if (n<=1)
        a1[1]=(m*sigma*D)/(dr*zmu*ft[1]);
    else
        a1[n]=sigma*D*(ft[n]+0.5)/(dr*dr*ft[n]);
        a2[n]=sigma*D*(ft[n]-0.5)/(dr*dr*ft[n]);
};
gl=znf*gbl;
b=m/ft[1];
for(n=1;n<=m;n++)
{
    if(n!=1)
        b=(ft[n]+1)/ft[n];
        rfac[n]=(a/gl)*log(b);
}
i=-1;
t=t0-dt;
sm=0.0;
for (n=1;n<=m;n++)
    sm+=zifac[n]*a*gbw_t[2];
am=(m*m)/2;
zi=(-vo)/(ra+a/sm);
if (fabs(vo) < 1e-8)
    zi=(-1e-2/(ra+a/sm));

/* Main programme loop*/

kt=0;
lauf=0;
while ((t+dt/5) <= tfm)
{
    Ek=RTF/2*log(co/c_in);
    if (t<=tfvp) // bis pulsende 1
    {
        vo=1e-19;
```

```

        if (PP_flag==1) dt=dt_vp;
    }
    else if (t>tfvp&&t<=tfp) // bis pulsende 2
    {
        vo=sp[v_count]-Ek;
        if (PP_flag==1) dt=dt_p;
    }
    else if (t>tfp&&t<=tfm) // bis simulationsende
    {
        vo=1e-19;
        if (PP_flag==1) dt=dt_m;
    }
    t+=dt;
    for(n=1;n<=m;n++)
        c[n]=ct[n];
    c_in=c_in_t;
    current(t);          /* call current subroutine*/

    kt++;
    /* print out every nth value, including t=0          */
    i++;

    st=0;
    for(n=1;n<=m;n++)
        st+=ct[n]*ft[n];
    cavr=st/am;
    rts=(-vo/zi);
    if (fitflag==1)
        gkt=(long double)gk1+(long double)gk2*vo+(long double)gk3*vo*vo+(long
double)gk4*vo*vo*vo;
    else if (fitflag==2)
    {
        x=(vo+Ek)*1e3;
        nenn=-(A1-A2)*exp((x-xo)/dx);
        zaehl=10.8*dx*pow(1+exp((x-xo)/dx),2);
        gkt=nenn/zaehl;
    }
    else if (fitflag==3)
    {
        x=(vo+Ek);
        gkt=(x-dhp_vca)/(1+exp((dhp_v05-x)/dhp_k))*dhp_norm;
    }

    rm=(rts*rsm)/((rsm+rts*gkt)*1000);
    zim=(zi-vo*gkt/rsm)*1e6;
    if (zi>0) c_in_t=c_in_t+dt/F*(4*zi)/a;
    /* cout << "time : " << (t+dt);*/

    if ( (i==0) || (i==nt) || (t==(tf-dt)))    /* data out in file
data_file*/
    {
        /* v-vlamp data zim,vo,cavr*1e6,rm */
        fclose(f_out);
        f_out=fopen(out_name,"a");

        fprintf(f_out,"%f, %f, %f, %f, %g, %g\n",t,-zim,-
zi*1e6,vo*1e3,cavr*1e6,c_in*1e6);

        /* if selected (prn_c = 1)*/
        /* radial concentration distribution c[n] output*/
        if (scr==1)
            printf("scr: %f, %f,%f,%f, %f, %f, %g\n",t,-zim,-
zi*1e6,vo*1e3,rm,cavr*1e6,c_in*1e6);

        if (prn_c==1)
        {

```

## Anhang

```

        for(n=1;n<=m;n++)
            fprintf(f_rad, " , %Lf ", c[n]*1e6);
        fprintf(f_rad, "\n");
    }
    /* if selected (scr_c =1)*/
    /* screen output */
    if (scr_c==1)
    {
        printf("%f, %f,%f ,%f, %f, %Lf, %Lf\n",t,-zim,-
zi*1e6,vo*1e3,rm,cavr*1e6);
        for(n=1;n<=m;n++)
            printf("%3.3Lf ", c[n]*1e6);
        printf("\n");
    }
    i=0;
}
/* Runge-Kutta subroutine */
/*zk1 */
dcndt(1);
for(n=1;n<=m;n++)
{
    zk1[n]=dt*dc[n];
    c[n]=ct[n]+zk1[n]/2;
};
current(t);
kt+=k;
/*zk2 */
dcndt(1);
kt=0;
for(n=1;n<=m;n++)
{
    zk2[n]=dt*dc[n];
    c[n]=ct[n]+zk2[n]/2;
};
current(t);
kt+=k;
/* zk3*/
dcndt(1);
for(n=1;n<=m;n++)
{
    zk3[n]=dt*dc[n];
    c[n]=ct[n]+zk3[n];
}
current(t);
kt+=k;
/* kz4*/
dcndt(1);
for(n=1;n<=m;n++)
    zk4[n]=dt*dc[n];
for(n=1;n<=m;n++)
    ct[n]=ct[n]+(zk1[n]+zk4[n]+2*(zk2[n]+zk3[n]))/6; /* (73)*/
/* end of Runge-Kutta*/
}; /*end of while */
} /* end of voltage steps */
} /* ----- END of Pulse protocol - ring steps */
end_time=time(NULL);
tot_time=difftime(end_time,start_time);

return(0);

}; /* END of main*/

```

### X. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die -- auf die eine oder andere Art und Weise -- zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle Danke ich meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rainer H. A. Fink, nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für das große in mich gesetzte Vertrauen, den Vorschlag und die Unterstützung, mich als Physiker in das GK "Biotechnologie" aufzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Michael Wink danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg "Biotechnologie" der Deutschen Forschungsgemeinschaft und für die Bereitschaft den Prüfungsvorsitz zu übernehmen. Ich habe durch das Graduiertenkolleg nicht nur finanzielle Unterstützung erhalten, sondern auch viele interessante Menschen kennen gelernt. Die anregenden Diskussionen und der Austausch über den "Fortgang der Promotion" (namentlich mit Joachim Koch, Rüdiger Bräuning und Holger Schäfer) waren für mich eine Aufmunterung, und ein Ansporn, auch in "schwierigeren Zeiten" durchzuhalten.

Aus der Arbeitsgruppe danke ich an erster Stelle Oliver Friedrich, für die "experimentelle Zusammenarbeit" und für das gemeinsame Erleiden von "Friedrich et al., 1999", "Ehmer et al. 2000" und für die kreativen Diskussionen mit der "scientific community". Vielen Dank auch an Dietmar Uttenweiler, der mich und meinen Umgang mit Computern und Compilern über Jahre hinweg in seinem "Denkzimmer" erduldet hat, und es auch nach mehreren gemeinsamen Konferenzteilnahmen in ganz Europa immer wieder schaffte, mich mit neuen Liedern zu überraschen, Claudia Veigel für klagloses Überlassen des Schreibtisches und eines "Hochleistungsrechners", an Martin Vogel für die prompte und bereitwillige Übernahme der Verwaltung der Internetseiten ([www.agfink.de](http://www.agfink.de)), mit aller Lust und allem Leid, das dazugehört, den gesamten "restlichen Finken" (allen voran Conny, Uwe und Wolfgang) danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und dafür, daß Ihr die Finken zu dem gemacht habt, was sie sind. Weiterhin danke ich Prof. Peter H. Barry von der University of New South Wales, Sydney, Australien, für das ständige Interesse und für die Mitwirkung an der Publikation und Prof. Dr. Lee Peachey, University of Pennsylvania, USA, nicht nur für die enorme Anzahl an Reprints, sondern auch für den anregenden Input an ultrastrukturellen Daten und besonders für das stetige Interesse am Output. Danke auch an Hans Hruschka und Sonja Nanda von der Buchbinderei Schaaf, Kandel, auch für die immer sorgfältige und empfehlenswerte Arbeit.

Natürlich konnte ich die Zeit, in der ich mich mit dieser Arbeit auseinandergesetzt habe, nur mit der Unterstützung meiner gesamten Familie mehr oder weniger unbeschadet überstehen. Vielen Dank an jeden von Euch, Oma und Opa für die "Oase der Ruhe", meinen Eltern für die Geduld, die Ratschläge und die Aufforderung, keine halben Sachen abzuliefern, meinem kleinen Bruder Peter für das Aufspüren von Euphemismen, Onkel Bernhard für den Praktikumsvorschlag, Karin und Günter und Patricia und Andreas für strategische Ratschläge und für das leibliche Wohlergehen.

Und nicht zu Letzt danke ich Alex. Für Alles. Es war ein wirklich langer "*moment of life's great adventure*", auf zu neuen Taten!